

Лигостаева Юлия Валерьевна

**Фармакогностическое исследование бересты и
перспективы ее использования в медицине**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2015

Диссертационная работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор **Ханина Миниса Абдуллаевна**

Официальные оппоненты:

Пупыкина Кира Александровна - доктор фармацевтических наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, профессор кафедры

Белоногова Валентина Дмитриевна - доктор фармацевтических наук, профессор, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники, заведующая кафедрой

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Иркутск

Защита состоится 16 октября 2015 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/science/referats>) государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Автореферат разослан « » июля 2015 года

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат фармацевтических наук,
доцент

Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Заболевания печени являются одним из ведущих видов патологии, не только в России, но и в мире. При этом разные категории больных имеют различную частоту и причины поражения печени (Суханов, Д.С., 2010).

К основным заболеваниям печени (гепатопатиям) относят: жировую инфильтрацию печени (капельки жира откладываются в гепатоцитах и повреждают их); острый гепатит (вирусная инфекция ведет к возникновению воспалительного процесса в гепатоцитах); хронический гепатит (часто возникают вследствие неизлечимого гепатита, вызванного вирусами, токсическими веществами); цирроз печени (Королева, Л.Р., 2005; Шерлок, Ш., 1999).

Наиболее часто гепатопатии возникают при действии химических соединений – ксенобиотиков, которые делят на две группы. В первую группу входят вещества, проявляющие прямое токсическое действие на печень и организм в целом. Вторую группу составляют вещества, которые становятся токсичными в процессе их метаболизма, среди которых важное место занимают лекарственные препараты (Щекатихина, А.С., 2009).

Лекарственные поражения печени являются одной из серьезных проблем в гепатологии. Насчитывается более 800 лекарственных средств, способных вызывать поражения печени (Еремина, Е.Ю., 2012; Суханов, Д.С., 2010).

Считается, что выраженность токсического повреждения печени, а также механизмы ее возникновения определяются балансом между тремя основными факторами: степенью образования токсических метаболитов, механизмом их токсического действия, а также защитным потенциалом самой печени (Мараховский, Ю.Х., 2004, 2005).

Выраженными гепатозащитными средствами являются гепатопротекторы.

Гепатопротекторы – лекарственные средства, улучшающие метаболические процессы в печени, повышающие ее устойчивость к патогенным воздействиям, а также способствующие восстановлению ее функций при различных повреждениях (Новиков, В.Е., 2005).

Основные требования к идеальному гепатопротектору были сформулированы R. Preisig в 1970г.: «высокая абсорбция, эффект «первого прохождения» через печень, способность предотвращать образование высокоактивных повреждающих соединений или связывать их, способность оказывать противовоспалительный эффект, антифибротические свойства, стимуляция регенерации печени, естественный метаболизм при патологии печени, экстенсивная энтерогепатическая циркуляция, отсутствие токсичности». Согласно этим требованиям конечной целью применения таких препаратов являются уменьшение воспалительных и дистрофических изменений в печени, усиление репаративных процессов в гепатоцитах, ослабление фиброгенеза, уменьшение гистологических изменений ткани печени и как следствие – снижение риска формирования осложнения печеночных заболеваний (Щекатихина, А.С., 2009).

В настоящее время существует большое количество гепатопротекторных препаратов, как природных, так и синтетических. В целом преобладающее использование имеют средства растительного происхождения – до 54%, на фосфолипидные препараты приходится до 16%, а на другие средства (синтетические, органолекарства, препараты аминокислот) – до 30% от общего количества «истинных» гепатозащитных средств. Однако, несмотря на большое количество гепатопротекторных препаратов, использующихся в медицинской практике, ни один из них не удовлетворяет в полной мере требованиям «идеального гепатопротектора» (Щекатихина, А.С., 2009).

С этой точки зрения к числу ценных источников биологически активных веществ перспективных для лечения и профилактики токсических повреждений печени относится береста.

Береза повислая (*Betula pendula* Roth.) и береза пушистая (*Betula pubescens* Ehrh.) семейства березовых (*Betulaceae*) относятся к числу основных лесообразующих пород России и широко используются не только в медицинских, но и в промышленных целях (Киселева Т.Л. и др., 2008; Самылина И.А. и др., 2003; 2010). В результате окорки березовой древесины накапливаются огромные количества бересты, которая не находит квалифицированного применения.

Исследования, проведенные отечественными и зарубежными учеными, показали, что береста и ее экстракты обладают широким спектром биологической активности: антиоксидантной (Дубинская, В.А., 2004; Коваленко, Л.П., 2005; Зайбель, И.А., 2007; Мещерякова, В.А., 2007;

Кузнецова, С.А., 2008), антигипоксантами (Дубинская, В.А., 2004; Калинкина, М.А., 2005), противовоспалительной (Носик, Н.Н., 2005; Позднякова, С.П., 2011), гиполипидемической (Воробьева, Е.Н., 2005; Мещерякова, В.А., 2007), противовирусной (Пушкина, Т.В., 2005; Ямникова, С.С., 2006; Борц, М.С., 2008), в том числе и гепатопротекторной (Стрелкова, Л.Б., 2007).

Однако, несмотря на значительные сырьевые запасы, высокую биологическую активность, изученность химического состава тритерпеноидов бересты находит применение только в народной медицине.

Степень разработанности темы. Объекты настоящего исследования ранее в химическом, хемотаксономическом, товароведческом, фармакологическом, технологическом отношении исследованы недостаточно. Имеются публикации зарубежных и отечественных авторов, посвященные большей частью исследованиям тритерпеноидов бересты и методам повышения выделения бетулина. В литературе имеются разрозненные сведения о составе других биологически активных соединений гидрофильной фракции бересты. Ранее не были проведены сравнительные фитохимические исследования бересты двух основных видов березы – березы пушистой и березы повислой, которые в основном и являются источниками бересты. В отечественной и зарубежной литературе не обнаружено сведений о влиянии механохимической активации на компонентный состав и выход биологически активных веществ из бересты. Наша работа позволила решить эти вопросы.

Учитывая выше изложенное, считаем целесообразным введение бересты в качестве нового вида лекарственного сырья. Для этого необходимо было решить целый ряд задач, чему посвящена настоящая диссертационная работа.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является комплексное фармакогностическое исследование бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens* для обоснования возможности использования ее для разработки новых эффективных лекарственных средств для лечения и профилактики токсических поражений печени.

Для достижения поставленной цели необходимо решение следующих задач:

1. Проведение общего фитохимического анализа бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens*.
2. Установление основных групп биологически активных веществ, разработка методик их количественного определения, проведение исследования динамики накопления действующих веществ в бересте.
3. Изучение влияния методов измельчения бересты на качественный состав и содержание основных групп биологически активных веществ.
4. Получение экстракта сухого из бересты и исследование его биологической активности.
5. Проведение анатомо-морфологических исследований для установления макро- и микроскопических признаков сырья – «Береста».
6. Установление показателей подлинности и доброкачественности лекарственного растительного сырья – «Береста».
7. Обобщение полученных данных и разработка проекта нормативного документа на бересту.

Научная новизна. Впервые проведено сравнительное фитохимическое исследование бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens*, произрастающих в разных географических зонах РФ.

Изучен состав гидроксикоричных кислот и кумаринов бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens*, впервые установлено наличие кислоты хлорогеновой и кумарина.

Исследован качественный состав и количественное содержание суммы аминокислот в бересте *Betula pendula* и *Betula pubescens* в зависимости от места произрастания. Изучено влияние возраста бересты на накопление в ней БАВ.

Впервые установлено присутствие метионина, треонина, фенилаланина, триптофана, лизина, орнитина, аланина, серина, пролина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, глутамина.

Микроскопический анализ бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens* позволил установить микроразностные признаки.

Установлено, что механохимическая активация бересты приводит к изменению качественного состава кумаринов, гидроксикоричных кислот, аминокислот; она способствует увеличению выхода большинства групп БАВ: тритерпеновых сапонинов, кумаринов, полифенольных окисляемых (дубильных) веществ и гидроксикоричных кислот.

В механохимически активированной бересте впервые выявлены кислоты: хлорогеновая и феруловая.

Проведено исследование влияния метода измельчения на элементный состав бересты и сухих экстрактов из них, полученных на 20 и 80% спирте этиловом. Установлено, что метод измельчения бересты не влияет на компонентный состав элементов, но оказывает значительное влияние на их содержание.

Впервые проведен микроскопический анализ механохимически активированной бересты и установлены ее микродиагностические признаки.

Определены оптимальные технологические параметры для получения сухих экстрактов из бересты, измельченной классическим способом и механохимически активированной бересты.

Скрининговые исследование противовоспалительной активности сухого экстракта, полученного из механохимически активированной бересты (экстрагент 20% спирт этиловый) (МХИБЭ20) свидетельствуют о его преимущественном влиянии на пролиферативную стадию воспалительного процесса.

Выявлена гепатопротекторная активность сухих экстрактов из бересты на различных моделях экспериментального токсического поражения печени. При этом активность МХИБЭ20 более выражена по сравнению с референтным препаратом – карсилом.

Практическая значимость. Данные о фитохимическом составе бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens*, полученные в результате проведенных исследований, могут быть использованы при целенаправленном создании новых фитопрепаратов из бересты, а также для введения ее в официальную медицину в качестве лекарственного растительного сырья.

Разработаны критерии, позволяющие установить подлинность сырья – «Береста», определены показатели его доброкачественности.

Предложены методики количественного определения суммы тритерпеновых сапонинов, дубильных веществ в бересте, которые введены в практику научных исследований и учебного процесса на кафедре фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава РФ, на кафедре фармакологии и фармацевтических дисциплин ГОУ ВО МО МГОГИ, на кафедре фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава РФ, на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава РФ. Разработанная методика количественного определения суммы аминокислот в бересте может быть использована при анализе других видов растительного сырья.

Результаты работы использованы при разработке проекта ФС на предлагаемый новый вид лекарственного сырья «Береста».

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований кафедры фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава РФ по теме «Поиск, изучение, создание и внедрение новых лекарственных средств растительного и синтетического происхождения и организационных форм фармацевтической деятельности» (№ государственной регистрации 012008074200) и комплексной целевой программой СО АМН Российской Федерации «Здоровье человека в Сибири» (№ государственной регистрации 01.9.2002479).

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования построена на изучении и обобщении литературных данных по теме исследования, оценке степени разработанности и актуальности темы. В соответствии с поставленной целью и задачами был разработан план выполнения всех этапов диссертационной работы; выбраны объекты исследования и подобран комплекс современных методов исследования.

Объектами исследования стали образцы бересты березы повислой и березы пушистой. В процессе исследования использованы фитохимические, аналитические, физические, физико-химические, морфологические и фармакологические методы анализа. Математическая обработка данных проводилась с использованием современных компьютерных технологий.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты сравнительного фитохимического анализа компонентного состава и количественного содержания основных групп БАВ бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens*.
2. Результаты анатомо-морфологических исследований сырья «Береста».
3. Результаты определения параметров стандартизации бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens*.

4. Результаты изучения влияния методов измельчения бересты на компонентный состав и количественное содержание основных групп БАВ.

5. Результаты исследований биологической активности сухих экстрактов, полученных из бересты.

Степень достоверности. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертационной работе являются обоснованными, достоверными и логически вытекающими из результатов эксперимента, что базируется на обширном фактическом материале, использовании современных методов анализа и подтверждается табличным материалом, рисунками и цифровыми фотографиями. Для обработки полученных результатов использовали программы: Waters Breeze2 Software, Bruker, IR SOLUTION. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы статистической обработки данных Statistica MS Excel. Для выявления статистической значимости различий использовали параметрический критерий Стьюдента.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: V Всероссийской научной конференции с международным участием "Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья" (Барнаул, 2012 г.); III Российской (итоговой) научно-практической конкурс - конференции студентов и молодых ученых «АВИЦЕННА - 2012» (Новосибирск, 2012г.); участие в школе молодых ученых «Наноматериалы и наноматериалы в электромагнитных и биомедицинских приложениях. Современные способы коммерциализации научных разработок» (с. Иогач, Республика Алтай, 2012г.); финальном мероприятии по программе «У.М.Н.И.К. - 2013» в рамках научно-инновационного всероссийского ежегодного фестиваля «Факел» (Новосибирск, 2013г.); Всероссийской конференции с международным участием «Молодые ученые – медицине» (аспирантские чтения 2013) (Самара, 2013г.); 69-ой Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (Екатеринбург, 2014г.), Всероссийской научной конференции молодых ученых образовательных учреждений среднего и высшего фармацевтического образования «Использование разработок отечественных производителей в области современной энтеросорбции в формировании профессиональных компетенций по специальности «Фармация» (Москва, 2015г.). Победа в конкурсе и получение гранта правительства Новосибирской области (Новосибирск, 2013г.).

Публикации. Основное содержание диссертации опубликовано в 14 научных работах, из них 5 статьи – в журналах, входящих в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК».

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в постановке цели и задач настоящего исследования, их реализации, анализе и обобщении экспериментальных данных, изложении полученных результатов в виде научных публикаций и нормативных документов. В работах, выполненных в соавторстве, автором лично проведена аналитическая и статистическая обработка, научное обоснование и обобщение полученных результатов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 2, 4 и 5 паспорта специальности фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Экспериментальные исследования по теме диссертации выполнены на кафедре фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)» Минздрава РФ; кафедре фармакологии ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава РФ; кафедре медицинской химии ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава РФ; кафедре патологической анатомии ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава РФ; а также в сотрудничестве с коллективами других научных организаций: Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск), ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии» (г. Новосибирск); Института химии твердого тела и механохимии СО РАН (г. Новосибирск); Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН (г. Новосибирск); ООО «Химико-аналитический центр «Плазма» (г. Томск). Сотрудникам данных подразделений выражаем искреннюю признательность и благодарность.

Особую признательность выражаем д.м.н., профессору О.Р. Греку, д.м.н., профессору В.И. Шарапову, к.м.н. М.А. Карпову, с.н.с. Т.Е. Алешиной, к.б.н. С.И. Байбородину, начальнику химико-аналитического отдела П.Н. Мирошникову.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 183 страницах машинописного текста, результаты исследований иллюстрированы 69 таблицами и 110 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 5-ти глав, отражающих результаты собственных экспериментальных исследований и их обсуждения, общих выводов, списка литературы, включающего в себя 291 источник, из которых 64 на иностранных языках и приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Характеристика объектов и методов исследования

Объектами исследования являлись гербаризированные образцы *Betula pendula* Roth. и *Betula pubescens* Ehrh., образцы свежего, консервированного и воздушно-сухого сырья - внешней части коры (бересты) березы повислой и березы пушистой, собранные из различных мест естественного произрастания в период 2012 – 2013 гг. на территории Новосибирской, Иркутской, Костромской областей, Пермского и Алтайского края и образцы, измельченные общепринятым методом и механохимической активацией.

Обнаружение основных групп БАС, компонентный состав и их количественное содержание определяли с помощью общепринятых в фитохимическом анализе и современных методов исследования, в частности БХ, ТСХ, ВЭЖХ, ЯМР-, ИК- спектроскопии, спектрофотометрии (СФ-56), масс-спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (Гринкевич, Н.И. и др., 1983; Андреева, В.Ю. и др., 2000; Ханина М.А. и др., 2006; Симонян, А.В. и др., 2007; Мальцева, А.А. и др., 2007).

Обнаружение БАВ проводили на хроматографе фирмы «Waters Breeze2» (насосный блок Waters 1525 Binary HPLC Pump) с УФ-детектором (UV/Visible Detector 2489), последующей обработкой результатов исследования с помощью программы Waters Breeze2 Software.

ЯМР-спектроскопию БАВ проводили на ЯМР-спектрометре Bruker DRX-500 для растворов в дейтерохлороформе (CDCl_3), содержащем тетраметилсилан. Стабилизация магнитного поля выполнялась с использованием резонансного сигнала дейтерия растворителя (CDCl_3). Для каждого БАВ регистрировали спектры на ядрах водорода (^1H) на частоте 500,1300233 МГц и углерода (^{13}C) на частоте 125,7578018 МГц. Спектры регистрировали при температуре 300 К. Для регистрации спектров использовали стандартные импульсные программы Bruker.

Регистрацию ИК - спектров БАВ проводили на спектрометре IRPrestige-21/FTIR-8400S (SHIMADZU) в области спектра 3500 – 400 см^{-1} с образцами в таблетках калия бромида. Обработка спектральной информации осуществлялась с помощью программы IR SOLUTION.

Элементный анализ проводили с применением метода масс-спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на приборе «ELAN – DRC».

Анатомо-морфологический анализ морфологических групп сырья (листья, береста) проводили на высушенном материале в соответствии с требованиями общих фармакопейных статей «Методы анализа лекарственного растительного сырья», «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» (ГФ XI, 1987).

При исследовании морфологических признаков сырья использовали стереоскопические бинокулярные микроскопы МБС-9 при увеличении 3,33×100.

Микроскопические исследования образцов сырья проводили на микроскопе «Микмед» при увеличении в 7×10, 10×10, 15×10, 7×40, 10×40, 15×40 раз. Фрагменты анатомической структуры фиксировали с использованием рисовального аппарата РА-7У, а также на микроскопе проходящего и отраженного света Axioskop 2 plus (Zeiss), тип лампы HBO 50 HAL 100, объективы Plan NEOFLUAR 10x/0.3 Ph1 Plan NEOFLUAR 20x/0.5 Ph 2 Plan NEOFLUAR 40x/0.75 Ph 2 Plan NEOFLUAR 100x/1.3

Oil, фильтры/лазеры Set 02 (G 365, FT 395, LP 420) (Zeiss) Set 10 (BP 450-490, FT 510, BP 515-565) (Zeiss) – Excitation – 489 nm, Emission – 509 nm, Set 15 (BP 546/12, FT 580, LP 590) (Zeiss), цифровая камера AxioCam HRc (Zeiss), программное обеспечение AxioVision (Zeiss). Отдельные фрагменты исследований выполнены на люминесцентном микроскопе SteREO Lumar.V12 (Zeiss), объективы HBO 50 KL 1500 LSD; тип лампы NeoLumar S 0.8x FWD 80mm; фильтры и лазеры Set 49(G 365, FT 395, BP 445/50) (Zeiss) Set 38 (BP 470/40, FT 495, BP 525/50) (Zeiss) Set 13 (BP 470/20, FT 495, BP 505/530) (Zeiss); цифровая камера Cool SNAP fx (Photometrics); программное обеспечение WinView (Roper Scientific) и на конфокальном сканирующем лазерном микроскопе LSM 510 META при увеличении до 600 раз в проходящем свете.

Стандартизацию цельного и измельченного сырья проводили согласно методикам ГФ XI, XII (1987, 2008 гг.). При разработке проекта ФС на сырье руководствовались ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества ЛС. Основные положения».

Исследования биологической активности сухих экстрактов выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой тела 200-250 г. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Минздравом РФ, в соответствии с Методическими рекомендациями «Деонтология медико-биологического эксперимента» (1987), а также с соблюдением правил гуманного обращения с животными (Report of the AVMA Panel on Euthanasia JAVMA, 2001).

Исследование острой токсичности (LD₅₀) сухих экстрактов, полученных из бересты, измельченной классическим методом (КИБЭ20) и механохимически активированной (МХИБЭ20, экстрагент - 20% спирт этиловый) проводили на 30 беспородных белых мышах-самцах средней массой 18 – 20 г. КИБЭ20 и МХИБЭ20 вводили однократно в желудок через зонд в виде водного раствора в дозах от 1000 до 5000 мг/кг. Проводили необходимые наблюдения в течение 14 дней. Отмечали отсутствие или наличие случаев летальности животных. По результатам эксперимента определяли класс опасности исследуемых объектов.

Противовоспалительные свойства МХИБЭ20 исследовали согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ».

Оценку противовоспалительной активности МХИБЭ20 проводили на двух моделях:

1. **Модель «каррагенинового отека»** (острое асептическое воспаление).
2. **Модель «ватной гранулемы»** (пролиферативное хроническое воспаление).

Оценку гепатопротекторной активности сухих экстрактов бересты проводили на моделях:

1. **Экспериментального токсического повреждения печени, вызванного введением парацетамола.**

Оценку гепатопротекторной активности МХИБЭ20 проводили на основе биохимических показателей (АлТ, мочевины, белковые фракции, ММП-2,7) и морфологических данных печени. Активность ММП-2,7 в образцах сыворотки крови определяли с использованием флуоресцентного субстрата (Calbiochem, США) по методу Nagase et al. Содержание белковых фракций в сыворотке крови крыс оценивали методом электрофореза на ацетат-целлюлозных пленках, содержание общего белка – биуретовым методом. Концентрацию билирубина, мочевины, АлТ определяли с использованием наборов (PLIVA-Lachema Diagnosticum, Чехия).

2. **Экспериментального острого токсического повреждения печени, вызванного введением четыреххлористого углерода.**

Действие экстрактов КИБЭ20 и МХИБЭ20 изучали на модели тетрахлорметанового гепатита. Гепатит моделировали интраперитонеальным введением 50% масляного раствора CCl₄ в дозе 0,2 мл/100 г массы животного однократно. Для изучения гепатозащитного действия КИБЭ20 крысы -

самцы массой 200-250 г были разделены на 5 групп: I – позитивный контроль (интактные животные); II - негативный контроль (тетрахлорметан); III, IV - перед введением CCl_4 вводили КИБЭ20 в дозе 100 и 50 мг/кг; V - перед введением CCl_4 вводили карсил в дозе 100 мг/кг. КИБЭ20 и препарат сравнения карсил профилактически вводили внутрижелудочно однократно в течение 5-ти суток. На 6-е сутки интраперитонеально вводили 50% масляный раствор CCl_4 в дозе 0,2 мл/100 г. На 4 - е сутки после введения CCl_4 животных выводили из эксперимента. Гепатопротекторное действие МХИБЭ20 (100 и 50 мг/кг) изучали на крысах - самцах массой 200-250 г, разделенных также на 5 групп, как и при исследовании гепатопротекторного действия КИБЭ20 (по выше указанной схеме).

Оценку гепатопротекторной активности КИБЭ20 и МХИБЭ20 проводили на основе биохимических показателей (АлТ, общий белок, белковые фракции, ММП-2,7) и морфологических данных печени.

Для светооптического исследования забирали печень экспериментальных животных. Гистологические препараты изучали на световом микроскопе CARL ZEISS Primastar при увеличении 100 и 400 раз. При помощи морфометрической сетки из 25 точек (16 квадратов), вставленной в окуляр, подсчитывали численную плотность двуядерных гепатоцитов (N_{ai}) в паренхиме печени на единицу тестовой площади 1600 мкм^2 , объемные плотности (V_v , %) очагов некрозов и дистрофически измененных гепатоцитов.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Фитохимический анализ бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens*

В бересте *B. pendula* и *B. pubescens* установлено присутствие первичных (аминокислоты, полисахариды) и вторичных метаболитов (тритерпеновые сапонины, полифенольные окисляемые вещества (дубильные вещества, преимущественно гидролизуемой группы), флавоноиды, кумарины, гидроксикоричные кислоты).

Методами хроматографии (БХ, ТСХ, ВЭЖХ) и ЯМР- и ИК-спектроскопии в бересте *B. pendula* и *B. pubescens* установлено наличие бетулина (тритерпеновые сапонины), кислоты хлорогеновой (гидроксикоричные кислоты), кумарина (кумарины) (табл.1).

Таблица 1

Результаты анализа компонентного состава основных групп БАВ бересты *Betula pendula* Roth. и *Betula pubescens* Ehrh.

Группа БАВ	Береста <i>B. pendula</i>	Береста <i>B. pubescens</i>
Тритерпеновые сапонины	Бетулин	Бетулин
Кумарины	Кумарин	Кумарин
Полифенольные окисляемые вещества (дубильные вещества)	Преимущественно гидролизуемой группы	Преимущественно гидролизуемой группы
Гидроксикоричные кислоты	Кислота хлорогеновая	Кислота хлорогеновая
Аминокислоты	Орнитин, пролин, лизин, серин, кислота аспарагиновая, глутамин, кислота глутаминовая, треонин, аланин, триптофан, метионин, фенилаланин	Орнитин, пролин, лизин, серин, кислота аспарагиновая, глутамин, кислота глутаминовая, треонин, аланин, триптофан

Установлено, что компонентный состав основных групп БАВ (тритерпеновые сапонины, дубильные вещества, кумарины, гидроксикоричные кислоты) одинаков у бересты березы повислой и березы пушистой независимо от места произрастания, за исключением аминокислот.

Методом ТСХ установлено присутствие бетулина в бересте, что также подтверждается его ЯМР-спектром (рис. 1).

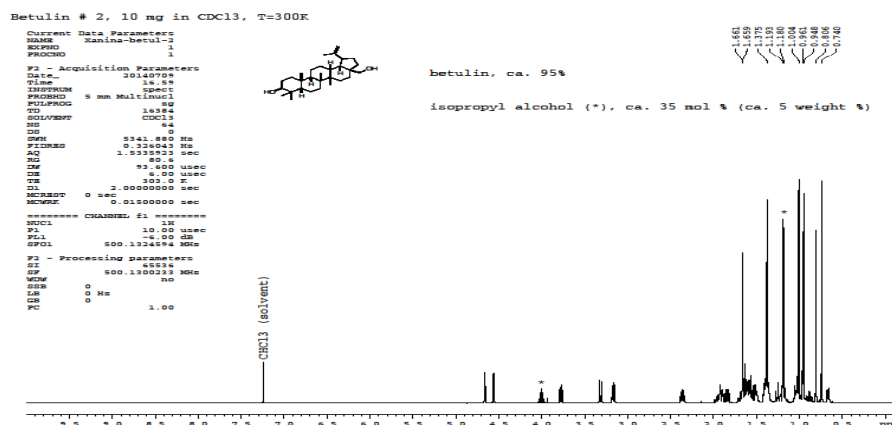


Рис. 1. ЯМР-спектр бетулина, выделенного из бересты на ядре изотопа водорода Н-1

При сравнительном анализе электронных спектров поглощения анализируемого вещества (в 96% спирте этиловом), суммарных извлечений из образцов бересты *B. pendula* и *B. pubescens* (экстрагент 96% спирт этиловый) со спиртовым раствором РСО бетулина выявили идентичность их электронных спектров поглощения в УФ области света (рис.2).

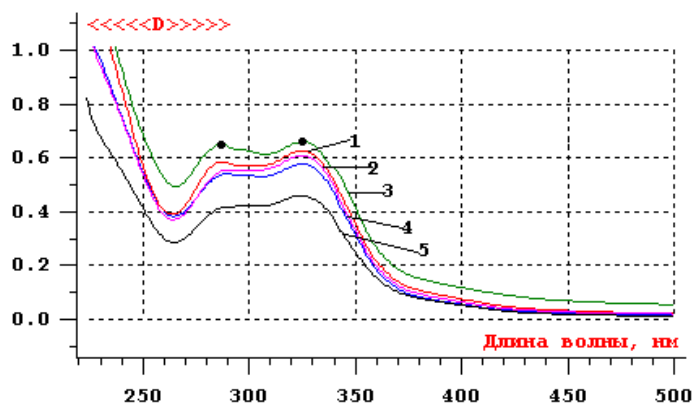


Рис. 2. Электронные спектры поглощения: 1, 2 - фракций №№ 1 и 2; 3 - стандартного образца бетулина (в 96% спирте этиловом) и 4, 5 - суммарных извлечений, полученных из образцов бересты №№ 2 и 5 с использованием 96% спирта этилового (max = 286 нм)

При исследовании кумаринов бересты методом препаративной хроматографии был выделено вещество х, имеющее наибольшую интенсивность свечения в УФ - свете и совпадающее по величине R_f (0,95) со стандартным веществом - кумарином.

Для идентификации выделенного кумарина использовали УФ- и ИК- спектроскопию.

В ИК-спектре выделенного кумарина идентифицированы полосы поглощения следующих структурных фрагментов (КВг, ν , см^{-1}): 1612, 1566, 1446 (Ar), 1734 ($>\text{C}=\text{O}$), что сопоставимо со спектральными характеристиками **ГСО** кумарина (рис. 3.).

Сравнительный анализ электронных спектров поглощения выделенного из исследуемого образца бересты кумарина и спиртового раствора ГСО кумарина показал их близость, что позволяет судить о присутствии и преобладании в сумме кумаринов бересты кумарина (рис. 4,5).

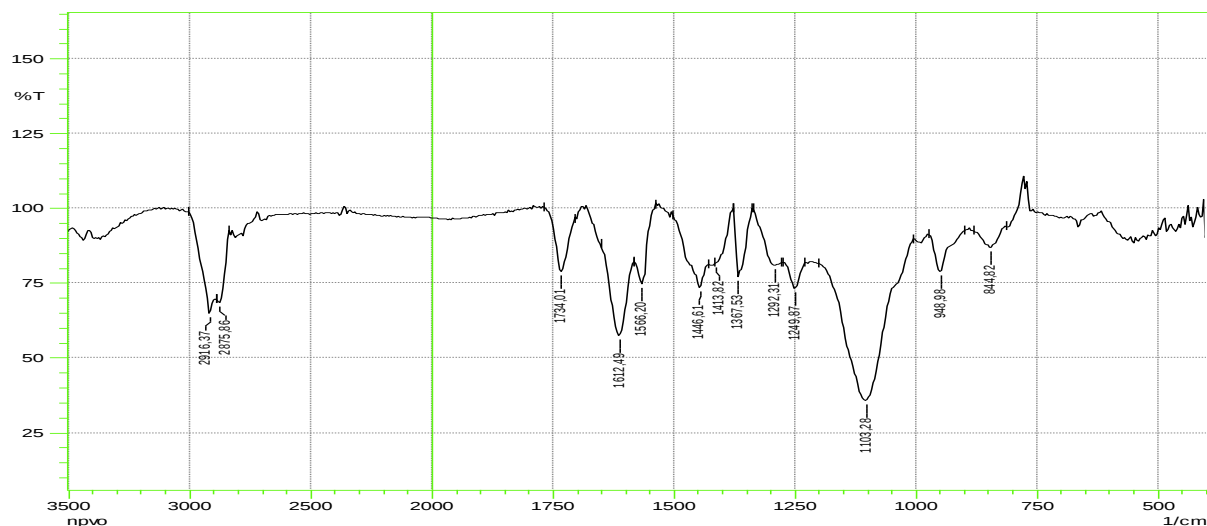


Рис. 3. Электронный спектр поглощения (ИК- спектр) кумарина, выделенного из бересты

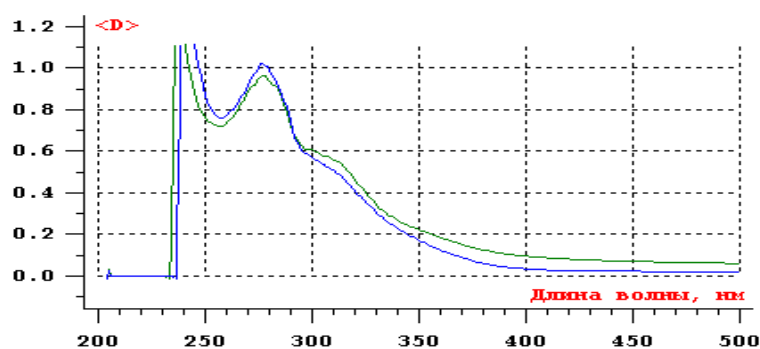


Рис. 4. Электронные спектры поглощения кумарина, выделенного из бересты (синий) и ГСО кумарина (зеленый) в 96% спирте этиловом

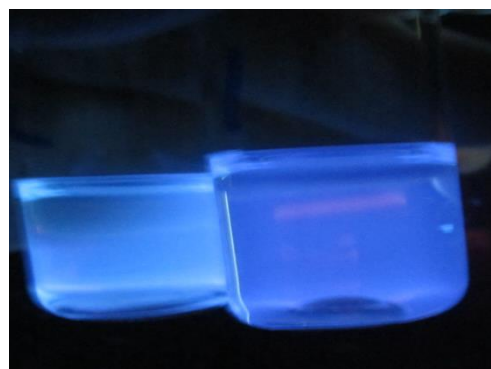


Рис. 5. Очищенная сумма кумаринов, выделенная из образцов бересты *B. pendula* и *B. pubescens* в УФ - свете

При сравнительном хроматографическом анализе суммарных извлечений из исследуемых образцов бересты выявлено, что кислота хлорогеновая является преобладающей в сумме гидроксикоричных кислот бересты *B. pendula* и *B. pubescens*. Препаративной хроматографией кислота хлорогеновая была выделена в индивидуальном виде и подвергнута анализу ВЭЖ-хроматографией, в результате которого установлена идентичность выделенного вещества и референтной кислотой хлорогеновой (рис.6).

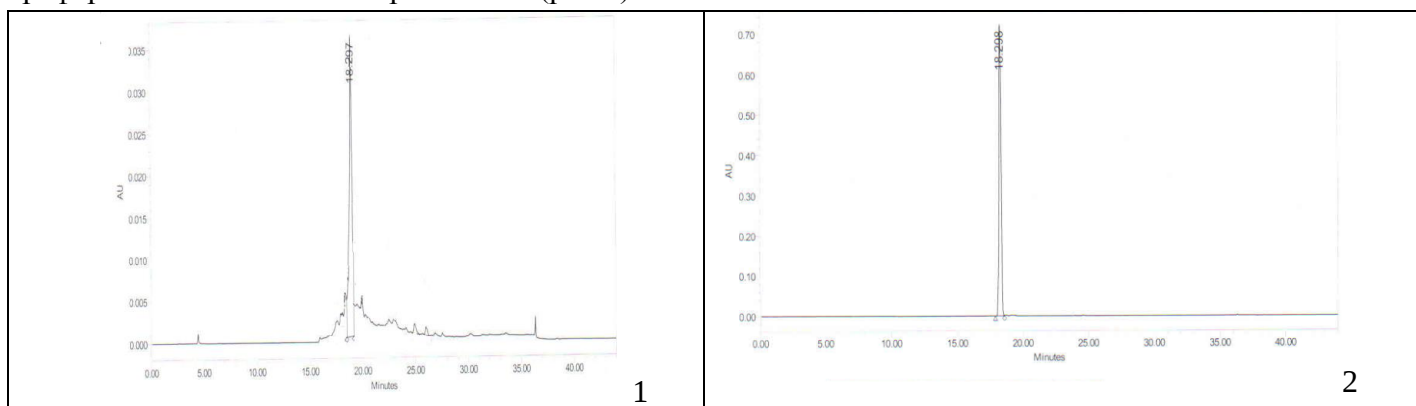


Рис. 6. Хроматограмма элюата вещества с $R_f=0,62$ ($t_R = 18,297$) (1) и хроматограмма кислоты хлорогеновой (ГСО) (2)

Хроматографический анализ суммарных извлечений, полученных из образцов бересты *B. pendula* и *B. pubescens* показал наличие 14 аминокислот, из которых были идентифицированы 12 -

метионин, треонин, фенилаланин, триптофан, лизин, орнитин, аланин, серин, пролин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, глутамин. Доминирующим компонентом в сумме аминокислот является аланин. Данный факт подтверждается результатами сравнительного хроматографического исследования аминокислот и совпадением рисунка спектров поглощения продуктов взаимодействия суммы аминокислот, содержащихся в извлечениях, полученных из исследуемых образцов бересты и индивидуальной аминокислоты – аланина с 0,2% спиртовым раствором нингидрина (рис. 7, 8).

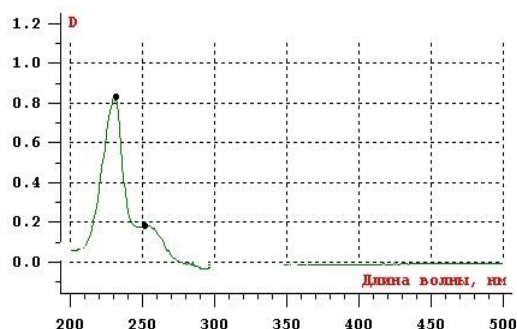


Рис. 7. Электронные спектры поглощения продуктов взаимодействия ГСО аланина с 0,2% спиртовым раствором нингидрина

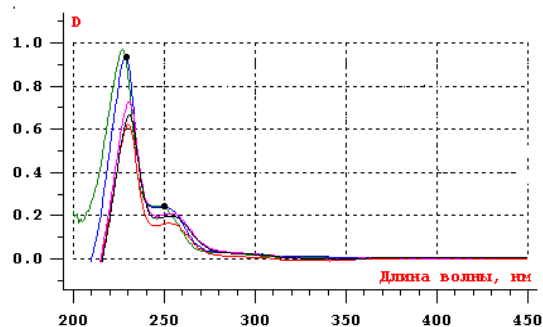


Рис. 8. Электронные спектры поглощения продуктов взаимодействия суммы аминокислот с 0,2% спиртовым (водным) раствором нингидрина (водное, 20,40,70,96% спиртовые извлечения образца бересты *B. pendula*)

2.2. Количественное содержание основных групп БАВ бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens*

Для анализа содержания тритерпеновых сапонинов в образцах бересты *B. pendula* и *B. pubescens* использовали метод прямой спектрофотометрии.

Определение содержания полифенольных окисляемых веществ (дубильных веществ) в образцах бересты *B. pendula* и *B. pubescens* проводили двумя методами: прямой спектрофотометрией в пересчете на танин и титриметрическим (ГФ XI, 1987) (табл.2).

Для определения содержания гидроокисных кислот и аминокислот использовали прямой вариант методики спектрофотометрии (табл. 2).

Таблица 2

Содержание доминирующих групп БАВ в бересте *Betula pendula* и *Betula pubescens* в зависимости от места произрастания ($M \pm m$, $n=3$)

Образцы **	Группы БАВ*			
	Тритерпеновые сапонины, %	Дубильные вещества, %	Гидроокисные кислоты, %	Аминокислоты, %
1	31,24±1,56	0,43±0,02	1,43±0,07	3,50±0,18
2	25,00±1,25	0,82±0,04	1,14±0,06	2,56±0,13
3	18,06±0,91	0,64±0,03	0,89±0,04	2,69±0,13
4	22,03±1,11	0,86±0,04	1,14±0,06	2,06±0,10
5	29,02±1,45	0,71±0,04	1,42±0,07	2,67±0,13
6	21,69±1,08	0,22±0,01	0,99±0,05	2,80±0,14
7	18,99±0,95	0,29±0,01	0,94±0,05	2,34±0,12
8	36,22±1,81	0,38±0,02	1,88±0,09	3,75±0,19

Примечание*: Тритерпеновые сапонины в пересчете на бетулин; дубильные вещества в пересчете на танин; гидроокисные кислоты в пересчете на кислоту хлорогеновую; аминокислоты в пересчете на аланин; **1 – береста *B. pendula*, березовый колод, Буготагские сопки (НСО); **2 - береста *B. pendula*, березовый лес, Колыванский район (НСО); **3 - береста *B. pendula*, березовый лес, Иркутская область; **4 - береста *B. pendula*, березовый колод, Венгеровский район (НСО); **5 – береста *B. pubescens*, Кудряшовский бор (НСО); **6 - береста *B. pubescens*, хвойно-

широколиственный лес, Алтайский край; **7 - береста *B. pubescens*, хвойно-широколиственный лес, Костромская область; **8 - береста *B. pubescens*, опушка леса, Пермский край.

Выявлено, что береста на всей поверхности ствола березы повислой по содержанию тритерпеновых сапонинов, дубильных веществ, гидроксикоричных кислот, аминокислот однородна (за исключением комлевой части ствола) (табл. 3).

Таблица 3

**Содержание доминирующих групп БАВ в бересте *B. pendula*
в зависимости от ее возраста ($M \pm m$, $n=3$)**

Образцы	Группы БАВ*			
	Тритерпеновые сапонины, %	Дубильные вещества, %	Гидроксикоричные кислоты, %	Аминокислоты, %
1,2 м	17,97 $\pm$ 0,90	0,59 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,04	2,66 $\pm$ 0,13
2 м	26,21 $\pm$ 1,31	0,58 $\pm$ 0,03	1,20 $\pm$ 0,06	2,42 $\pm$ 0,12
3,2 м	26,80 $\pm$ 1,34	0,58 $\pm$ 0,03	1,23 $\pm$ 0,06	2,72 $\pm$ 0,14
5,7 м	24,26 $\pm$ 1,21	0,56 $\pm$ 0,03	1,10 $\pm$ 0,06	2,83 $\pm$ 0,14
12 м	21,72 $\pm$ 1,09	0,54 $\pm$ 0,03	0,99 $\pm$ 0,05	2,97 $\pm$ 0,15
14 м	22,40 $\pm$ 1,12	0,57 $\pm$ 0,03	1,02 $\pm$ 0,05	2,51 $\pm$ 0,13

Примечание: высота (м) – расстояние от основания ствола дерева до участка на стволе, где были взяты образцы бересты для исследования.

Для анализа содержания кумаринов использовали прямой вариант спектрофотометрии: в первом случае – без очистки суммарного извлечения от сопутствующих веществ и во втором случае – с очисткой (табл. 4).

Таблица 4

Содержание кумаринов в образцах бересты *B. pendula* и *B. pubescens* ($M \pm m$, $n=3$)

Образцы бересты	Метод спектрофотометрии с очисткой суммы кумаринов от сопутствующих веществ	Метод спектрофотометрии без очистки суммы кумаринов от сопутствующих веществ
	Содержание кумаринов (в пересчете на кумарин, в %)	
<i>B. pendula</i>	0,23 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,03
<i>B. pubescens</i>	0,26 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,03

Таким образом, в пределах одного промыслового района *B. pubescens* превосходит *B. pendula* по содержанию в бересте отдельных групп БАВ - тритерпеновых сапонинов и гидроксикоричных кислот; по содержанию аминокислот, кумаринов и дубильных веществ существенных различий не обнаружено; место произрастания влияет на содержание всех перечисленных групп БАВ бересты.

3. Разработка параметров стандартизации бересты

Стандартизацию сырья предложено проводить по двум группам веществ – тритерпеновым сапонином и дубильным веществам, так как они являются преобладающими в бересте *B. pendula* и *B. pubescens* и предполагается, что они имеют наибольшую значимость в проявлении биологической активности экстрактов из нее.

3.1. Методика количественного определения тритерпеновых сапонинов

Для получения извлечения около 1,0 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц 3 мм, помещают в колбу с обратным холодильником и экстрагируют 40 мл 96% спиртом этиловым на водяной бане в течение 30 мин с момента закипания экстрагента. Извлечение в горячем виде фильтруют через бумажный фильтр, который возвращают в колбу с сырьем. Экстракцию повторяют дважды в тех же условиях. Фильтраты объединяют и измеряют точный объем извлечения.

Оптическую плотность извлечения измеряют при длине волны 286 нм на приборе СФ-56 в кювете с толщиной слоя 10 мм. При величинах оптической плотности (D) более 0,8 необходимо

проводить разведение извлечения. Определение суммы тритерпеновых сапонинов осуществляют в пересчете на бетулин. Раствор сравнения – 96% спирт этиловый.

Содержание суммы тритерпеновых сапонинов (X) рассчитывают в процентах в пересчете на абсолютно-сухое сырье по формуле:

$$X = D \times V_{\text{изв}} \times V_{\text{разв}} \times m_1 \times 100 / D_0 \times V_{\text{ал}} \times m \times V \times (100 - w), \text{ где}$$

D – оптическая плотность анализируемого раствора;

$V_{\text{изв}}$ – объем анализируемого извлечения, мл;

$V_{\text{разв}}$ – объем разведения анализируемого извлечения, мл;

m_1 – навеска РСО бетулина, г;

D_0 – оптическая плотность раствора РСО бетулина;

$V_{\text{ал}}$ – объем аликвоты анализируемого извлечения, мл;

m – навеска сырья, г;

V – объем раствора РСО бетулина, мл;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Примечание:

Приготовление раствора РСО бетулина: 0,0617 г (точная навеска) РСО бетулина помещают в мерную колбу на 25 мл, приливают 15 мл 96% спирта этилового, тщательно перемешивают (слегка нагревают на водяной бане, затем раствор охлаждают до комнатной температуры), доводят до метки 96% спиртом этиловым и перемешивают.

Метрологическая характеристика метода количественного определения в бересте тритерпеновых сапонинов в пересчете на бетулин представлена в таблице 5.

Таблица 5

Метрологическая характеристика метода количественного определения тритерпеновых сапонинов в пересчете на бетулин в бересте

n	f	$\bar{x}_{\text{ср.}}$	s^2	s	P, %	t (p, f)	$\Delta \bar{x}_{\text{ср.}}$	$\epsilon, \%$
10	9	25,189	0,708	0,842	95	2,26	0,602	2,389

Для проверки воспроизводимости разработанной методики проводили 10 независимых определений для каждого образца сырья, относительные ошибки методики не превышали 5%.

Предложенная методика количественного определения тритерпеновых сапонинов в пересчете на бетулин в бересте надежна и дает воспроизводимые результаты. Опыты с добавками образца РСО бетулина к исследуемому раствору показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки при использовании данной методики.

Содержание сапонинов в бересте должно быть не менее 15,0 %.

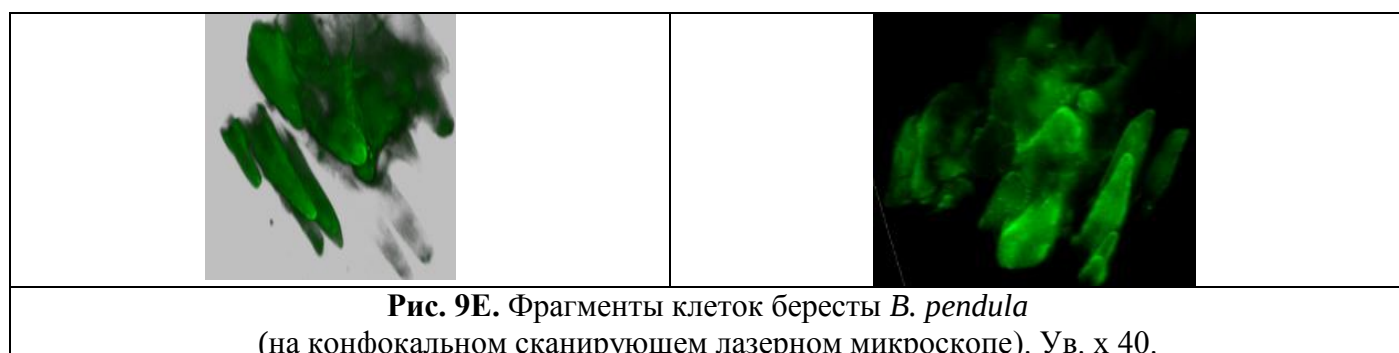
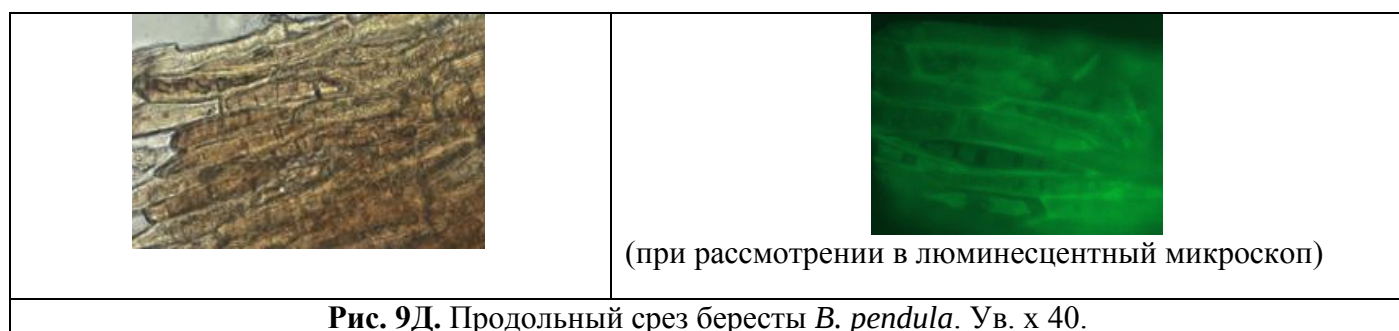
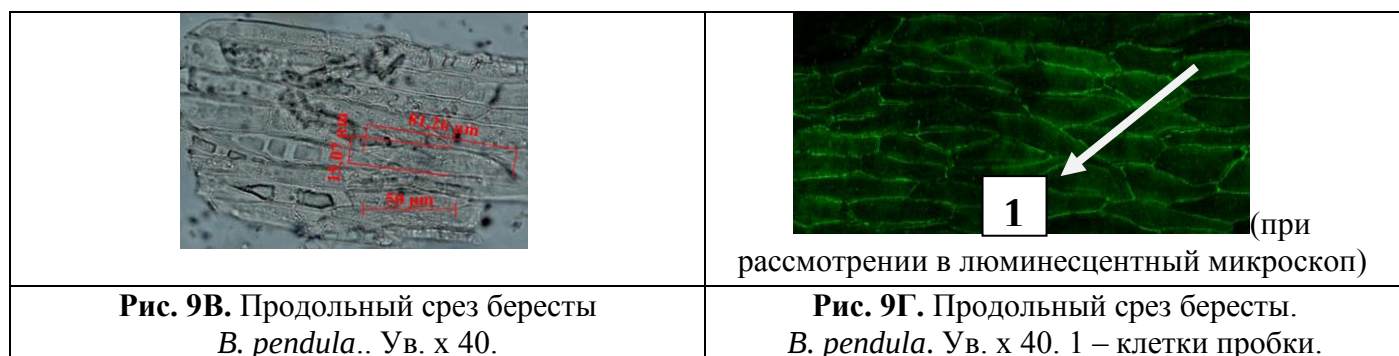
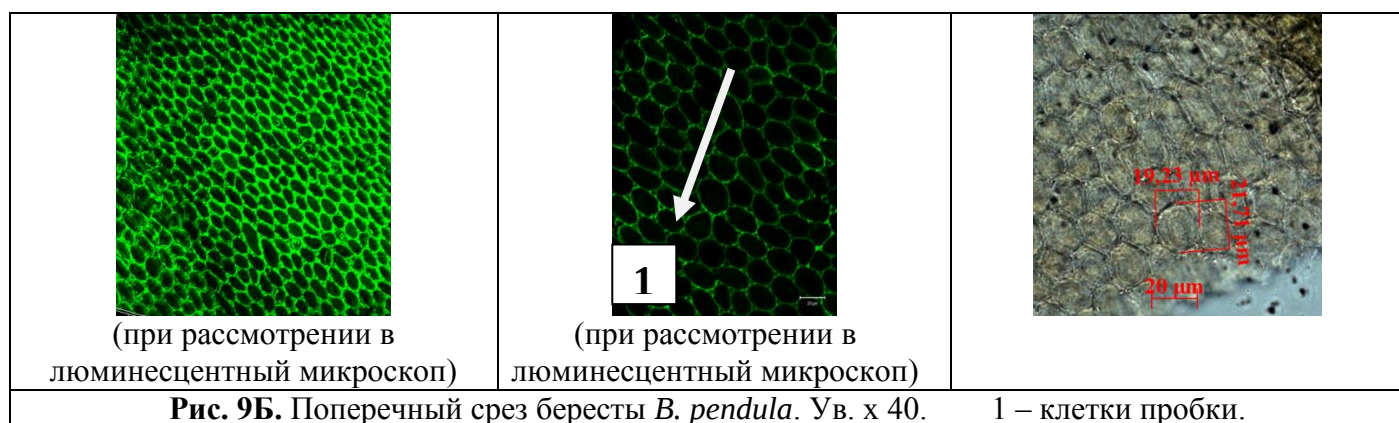
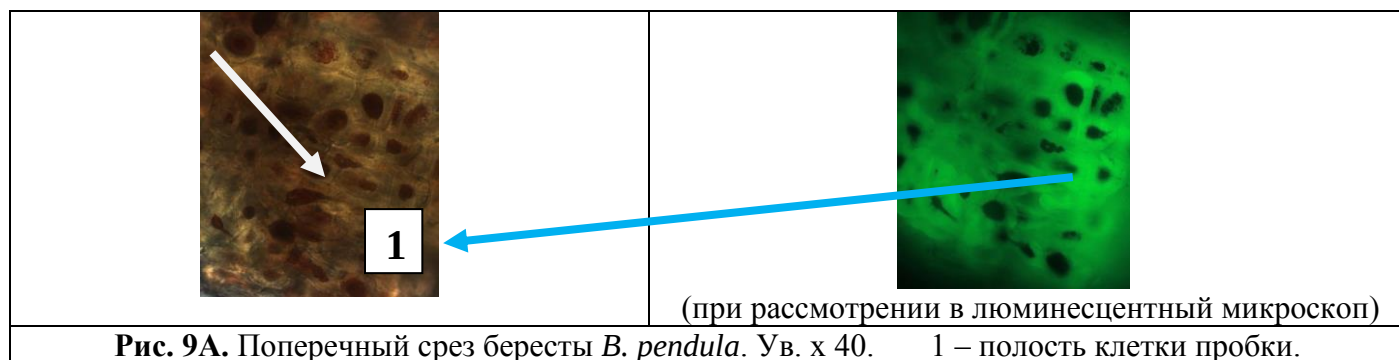
Содержание дубильных веществ в бересте должно быть не менее 0,15%.

3.2. Показатели подлинности сырья

На основании проведенных исследований были установлены микродиагностические признаки сырья - бересты *B. pendula* и *B. pubescens*.

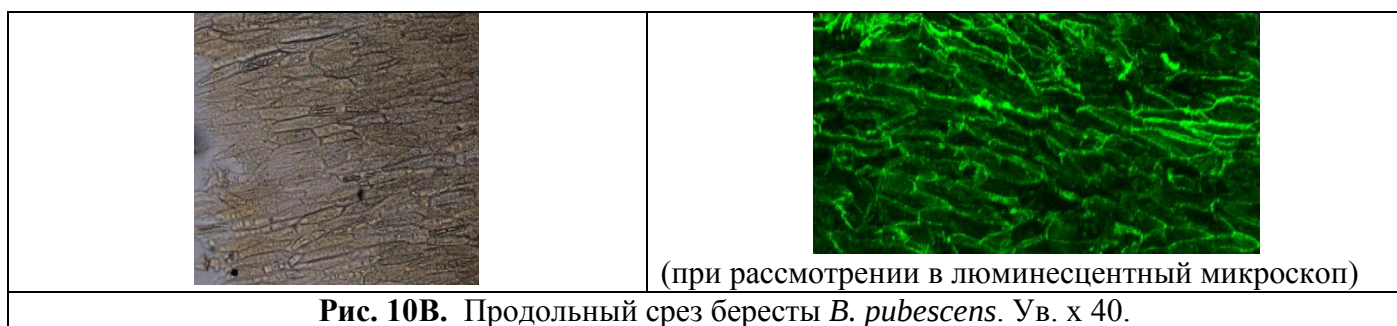
Микроскопия бересты *B. pendula*

На поперечном срезе бересты могут быть обнаружены клетки округлой формы с сильно утолщенными стенками при этом полость клеток узкая, заполнена воздухом, видны поровые каналца (рис. 9А), а также со стенками без существенного утолщения (рис. 9 - Б, В). На продольном срезе бересты наблюдаются клетки прозенхимные с заостренными двумя концами и с утолщенными стенками (рис. 9 - Г, Д, Е).



Микроскопия бересты *B. pubescens*

На поперечном срезе бересты могут быть обнаружены клетки округлой формы с сильно утолщенными стенками при этом полость клеток узкая, заполнена воздухом, видны поровые каналы (рис. 10А), а также со стенками без существенного утолщения (рис. 10Б). На продольном срезе бересты наблюдаются клетки прозенхимные с заостренными двумя концами и с утолщенными стенками (рис. 10В).



При сравнительном микроскопическом исследовании образцов бересты *B. pendula* и *B. pubescens* существенных различий выявлено не было.

3.3. Показатели доброкачественности сырья

Согласно перечню разделов фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье, утвержденному ОСТ 91.500.05.001-00, установлены числовые показатели для сырья (табл. 6).

Таблица 6

Числовые показатели бересты

Показатели	Нормы (%)
Тритерпеновые сапонины	Не менее 15,0
Дубильные вещества	Не менее 0,15
Влажность	Не более 3,0
Зола общая	Не более 1,0
Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями с диаметром 7 мм	Не более 2,0
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями с диаметром 0,315 мм	Не более 1,0

Результаты проведенных исследований использованы при разработке проекта ФС «Березы повислой и березы пушистой береста – *Betulae pendulae* и *Betulae pubescens cortex betulinus*».

4. Механохимическая активация бересты

4.1. Фитохимический анализ бересты, измельченной классическим методом и механохимически активированной

При проведении общего фитохимического анализа КИБ (классически измельченная береста) и МХИБ (механохимически активированная береста) установили, что образцы по составу основных групп БАВ различий не имеют.

Методами хроматографии (БХ, ТСХ, ВЭЖХ) выявлено, что механохимическая активация бересты приводит к изменению компонентного состава кумаринов, гидроксикоричных кислот, аминокислот (табл. 7.)

Таблица 7

Результаты анализа компонентного состава основных групп БАВ КИБ и МХИБ

Группа БАВ	КИБ	МХИБ
Тритерпеновые сапонины	Бетулин	Бетулин
Кумарины	(10 веществ – идентифицирован кумарин)	(12 веществ – идентифицирован кумарин)
Полифенольные окисляемые вещества (дубильные вещества)	Преимущественно гидролизуемой группы	Преимущественно гидролизуемой группы
Гидроксикоричные кислоты	(6 веществ – идентифицирована кислота хлорогеновая)	(28 веществ - идентифицированы кислоты хлорогеновая и феруловая)
Аминокислоты	Орнитин, пролин, лизин, кислота аспарагиновая, кислота глутаминовая, треонин, аланин, триптофан	Орнитин, пролин, серин, глутамин, кислота глутаминовая, аланин, триптофан, валин, фенилаланин, лейцин
Химические элементы	61 элемент	61 элемент

4.2. Исследование элементного состава КИБ и МХИБ

Анализ элементного состава образцов КИБ и МХИБ показал присутствие 61-го элемента. Все исследуемые образцы по компонентному составу различий не имеют (табл. 8).

Таблица 8

Элементный состав образцов КИБ и МХИБ (в мкг/г на воздушно сухое сырье)

Элемент	Образцы		Элемент	Образцы		Элемент	Образцы	
	КИБ	МХИБ		КИБ	МХИБ		КИБ	МХИБ
Li	0,022	0,44	As	<0,0005	<0,0005	Eu	0,0001	0,0052
Be	<0,001	<0,001	Se	0,16	0,49	Gd	0,0015	0,022
B	1,53	12,5	Br	1,01	0,76	Tb	0,0003	0,0039
Na	47,6	361,0	Rb	0,20	1,67	Dy	0,0013	0,014
Mg	171,0	660,0	Sr	2,30	34,3	Ho	0,0003	0,0035
Al	21,7	249,01	Y	0,011	0,098	Er	0,0002	0,0075
Si	164,0	197,0	Zr	0,060	0,36	Tm	0,0002	0,0012
P	70,5	492,0	Nb	0,0038	0,045	Yb	0,0002	0,0063
K	332,0	1984,0	Mo	0,031	0,51	Lu	0,0001	0,001
Ca	239,0	5750,0	Ag	0,014	0,020	Hf	0,0011	0,0082
Ti	1,53	16,6	Cd	0,12	0,33	Ta	0,0014	0,0072
V	0,077	0,50	Sn	0,23	2,75	W	0,0037	2,11
Cr	1,81	73,8	Sb	0,010	0,27	Au	0,0011	0,0014
Mn	142,0	141,0	I	0,14	0,091	Hg	0,0068	0,0091
Fe	19,2	757,0	Cs	0,0029	0,064	Tl	0,0006	0,0087
Co	0,033	0,59	Ba	5,75	40,3	Pb	0,10	1,20
Ni	0,96	19,0	La	0,019	0,14	Bi	0,053	0,67
Cu	6,93	5,36	Ce	0,027	0,26	Th	0,0033	0,028

Zn	52,1	69,5	Pr	0,0028	0,029	U	0,0011	0,0080
Ga	0,049	0,42	Nd	0,010	0,11			
Ge	0,0037	0,056	Sm	0,0011	0,025			

Примечание: в таблице приведены средние значения 5 измерений

Установлено, что механохимическая активация бересты приводит к увеличению содержания отдельных элементов в ней.

4.3. Количественное содержание основных групп БАВ КИБ и МХИБ

Механохимическая активация бересты приводит к увеличению выхода большинства групп БАВ: тритерпеновых сапонинов, кумаринов, полифенольных окисляемых (дубильных) веществ и гидроксикоричных кислот, при этом выход аминокислот практически не изменяется (табл. 9).

Таблица 9

Содержание доминирующих групп БАВ в КИБ и МХИБ ($M \pm m$, $n=3$)

Группы БАВ	Образцы	
	КИБ	МХИБ
Тритерпеновые сапонины, %	30,60 $\pm$ 1,53	44,19 $\pm$ 2,21
Дубильные вещества, %	0,73 $\pm$ 0,04	3,86 $\pm$ 0,19
Кумарины, %	0,25 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,04
Гидроксикоричные кислоты, %	1,05 $\pm$ 0,08	1,85 $\pm$ 0,09
Аминокислоты, %	2,62 $\pm$ 0,13	2,48 $\pm$ 0,12

4.4. Разработка параметров стандартизации МХИБ

4.4.1. Показатели подлинности МХИБ

Микроскопия МХИБ

При механохимической активации происходит разрушение клеточных стенок, поэтому при микроскопическом исследовании наблюдаются бесформенные глыбки пробковой ткани (рис. 11 – А, В). При исследовании препаратов в УФ-свете наблюдается отсутствие клеточной структуры – свечение характерно для всей массы, наблюдаемой в микроскоп (рис. 11 – Б, В).

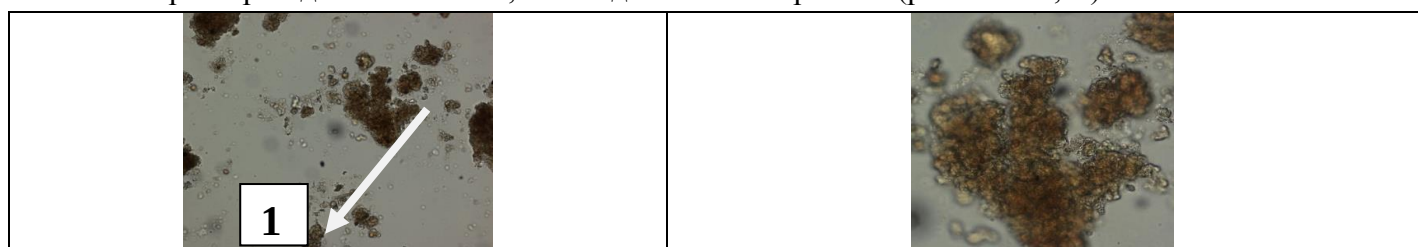


Рис. 11А. Фрагменты бересты механохимически активированной (в видимом свете). Ув. х 40.
1 – глыбки пробковой ткани.

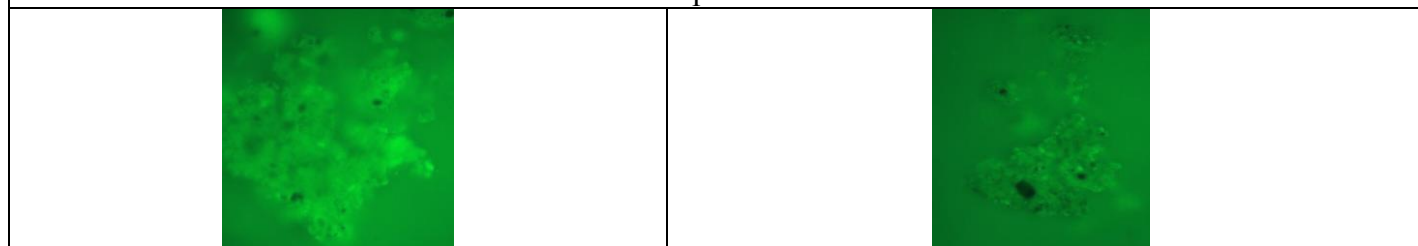


Рис. 11Б. Фрагменты бересты механохимически активированной
(на люминесцентном микроскопе). Ув. х 40.

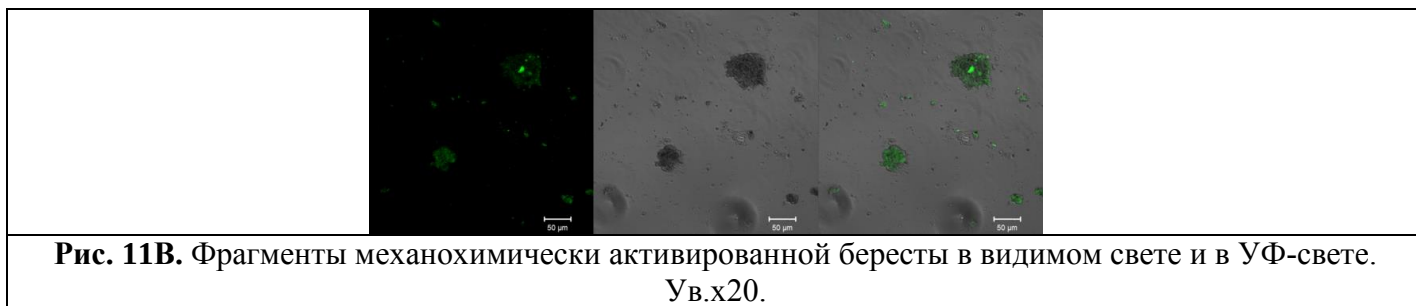


Рис. 11В. Фрагменты механохимически активированной бересты в видимом свете и в УФ-свете.
Ув.х20.

Сравнительный анализ данных микроскопии КИБ и МХИБ показал, что клеточные структуры как в цельном, так и в разрушенном виде обладают автофлуоресценцией, что может связано с наличием БАВ, способных флуоресцировать в УФ-свете и сохраняться при механохимической активации.

4.4.2. Показатели доброкачественности сырья - МХИБ

Согласно перечню разделов фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье, утвержденному ОСТ 91.500.05.001-00, установлены числовые показатели для стандартизации сырья - МХИБ (табл. 10).

Таблица 10

Числовые показатели МХИБ

Показатели	Нормы (%)
Тритерпеновые сапонины	Не менее 40,0
Дубильные вещества	Не менее 3,0
Влажность	Не более 3,0
Зола общая	Не более 2,0

5. Исследование химического состава экстрактов

Экстракт из КИБ (экстрагент 20% спирт этиловый) – светлый порошок с приятным запахом, горьковатым и слегка вяжущим вкусом, растворим в воде (КИБЭ20).

Экстракт из МХИБ (экстрагент 20% спирт этиловый) – порошок темно-коричневого цвета, с насыщенным приятным запахом, выраженным вяжущим и горьковатым вкусом, растворим в воде (МХИБЭ20).

Химический анализ показал, что КИБЭ20 и МХИБЭ20 содержат все основные группы соединений, характерные для исходного сырья – «Береста» (табл. 11).

Таблица 11

Товароведческие и числовые показатели сухих экстрактов из КИБ и МХИБ, полученных на 20% спирте этиловом

Показатели	Содержание КИБЭ20	Содержание МХИБЭ20
Дубильные вещества, %	27,43±1,37	41,96±2,10
Гидроксикоричные кислоты, %	3,85±0,19	9,86±0,49
Кумарины, %	7,96±0,40	12,78±0,64
Аминокислоты, %	3,65±0,18	3,22±0,16
Влажность, %	3,71±0,19	3,42±0,17
Зола общая, %	4,97±0,25	6,25±0,31

6. Исследование биологической активности экстрактов бересты сухих (КИБЭ20, МХИБЭ20)

Острая токсичность. КИБЭ20 и МХИБЭ20 согласно ГОСТ 121007-76 (Государственный стандарт на вредные вещества) относятся к 4 классу опасности: «вещества малоопасные».

Противовоспалительные свойства. Проведенные скрининговые исследования свидетельствуют о наличии системной противовоспалительной активности у МХИБЭ20 с преимущественным влиянием на пролиферативную стадию воспалительного процесса.

По результатам исследования антипролиферативного действия МХИБЭ20 на модели «ватной гранулемы» установлено, что введение экстракта в дозе 50 мг/кг способствует снижению воспалительного разрастания гранулематозно-фиброзной ткани у животных на 38,64% по сравнению с контрольной группой.

Массу экссудата в очаге хронического воспаления МХИБЭ20 в дозе 50 мг/кг снижал на 38,5%, препарат сравнения – кислота ацетилсалициловая в дозе 20 мг/кг – на 23,1%.

Установлено, МХИБЭ20 в дозе 150 мг/кг и препарат сравнения – кислота ацетилсалициловая в дозе 20 мг/кг ослабляли флогогенное действие каррагинина, снижая отек воспалительной лапы соответственно на 67,4% и 52,2%, по сравнению с группой контроля.

Оценка гепатопротекторной активности МХИБЭ20 на модели экспериментального токсического повреждения печени, вызванного введением парацетамола. В результате проведенного исследования установлено, что на 7-е сутки после введения парацетамола снижалось содержание альбумина ($48,82 \pm 0,97$ - $41,81 \pm 0,87$, $p < 0,001$) и γ -глобулина ($13,23 \pm 0,57$ - $10,71 \pm 0,58$, $p < 0,01$).

На фоне профилактического введения карсила и МХИБЭ20 концентрация альбумина в сыворотке крови повышалась (парацетамол - $41,81 \pm 0,87$; карсил+парацетамол $46,06 \pm 0,93$, $p < 0,01$, МХИБЭ20+парацетамол - $44,19 \pm 0,8$, $p < 0,01$). В отличие от группы крыс с введением карсила, профилактическое введение МХИБЭ20 не сопровождается снижением содержания в сыворотке γ -глобулина (карсил+парацетамол - $9,9 \pm 0,55$; МХИБЭ20+парацетамол - $11,1 \pm 0,79$).

При введении парацетамола активность АЛТ в сыворотке повышалась в 4,2 раза по сравнению с группой контроля ($2,31 \pm 0,29$ и $0,55 \pm 0,05$ ммоль/л $\times$ ч, $p < 0,05$ соответственно), содержание прямого билирубина увеличивалось на 63%, мочевины – 22,3% по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

На фоне профилактического введения карсила активность АЛТ снижалась в 2 раза, содержание мочевины – в 1,4 раза, концентрация прямого билирубина оставалась повышенной. Профилактическое введение МХИБЭ20 приводило к снижению активности АЛТ в сыворотке в 2,2 раза, содержание прямого билирубина – в 3,4 раза, мочевины – в 1,6 раза.

Активность в сыворотке ММП – 2,7 при введении парацетамола возрастала до $259,7 \pm 14,7$ мкмоль/л/ч по сравнению с контролем $190,4 \pm 11,35$ мкмоль/л/ч, $p < 0,001$. На фоне профилактического введения карсила парацетамол не вызывал достоверных изменений активности ММП – 2,7 (контроль - $190,4 \pm 11,35$ мкмоль/л/ч; карсил +парацетамол $180,9 \pm 7,22$ мкмоль/л/ч, $p > 0,05$). Профилактическое введение МХИБЭ20 сопровождалось дальнейшим снижением активности ММП – 2,7 (контроль - $190,4 \pm 11,35$ мкмоль/л/ч; МХИБЭ20+парацетамол – $171,0 \pm 2,77$ мкмоль/л/ч).

Морфологическое исследование печени

Внутрижелудочное введение парацетамола крысам на 7-е сутки сопровождалось выраженными деструктивными изменениями в паренхиме печени крыс: обнаруживали обширные поля центролобулярных некрозов, объемная плотность которых достигала 49%, а объемная плотность гепатоцитов в состоянии вакуольной дистрофии, вплоть до баллонной дистрофии, составляла 43,9%. При этом численная плотность двуядерных гепатоцитов была на 15% меньшей, в сравнении с величиной аналогичного показателя у интактных животных, свидетельствуя об угнетении процесса репаративной регенерации на клеточном уровне в печени у крыс, получавших парацетамол.

У животных 2-й (карсил+парацетамол) и 3-й групп (МХИБЭ20+парацетамол) макроскопически печень была плотно-эластической консистенции и имела красно-коричневую окраску. Некротизированные гепатоциты встречались диссеминированно в центральных отделах печеночных долек, на их периферии, а также перисинусоидально. Объемная плотность некрозов

гепатоцитов была в 2,4 и в 2,7 раз соответственно меньшей, в сравнении с величиной аналогичного показателя у животных 1-й группы (контроль парацетамол). При этом в паренхиме печени животных 2-й и 3-й групп преобладали дистрофические изменения гепатоцитов в виде мелко- и крупновacuольной дистрофии. Примечательно, что в паренхиме печени животных 3-й группы объёмные плотности некрозов и дистрофически изменённых гепатоцитов были на 11,3 и 7,5 % соответственно меньшими, в сравнении с таковыми у животных 2-й группы. Объёмная плотность неизменённых гепатоцитов у животных, которым профилактически вводили МХИБЭ20, была на 37 % большей, чем у животных с предварительным введением карсила, при этом и численная плотность двуядерных гепатоцитов у крыс, получавших МХИБЭ20, было на 7 % больше в сравнении с величиной аналогичного показателя у животных, получавших карсил.

Данные эксперимента свидетельствуют о менее выраженных токсических эффектах парацетамола на фоне профилактического введения как карсила, так и МХИБЭ20, очевидно, в связи со стимулированием репаративного процесса в паренхиме печени, что подтверждается большей численной плотностью двуядерных гепатоцитов в печени животных 2-й и 3-й групп (в 1,8 и в 2,8 раз соответственно), в сравнении с таковой у животных 1-й группы и интактных животных.

Оценка гепатопротекторной активности КИБЭ20 и МХИБЭ20 на модели экспериментального острого токсического повреждения печени, вызванного введением четыреххлористого углерода.

На 4-е сутки после введения тетрахлорметана в сыворотке крови снижалось содержание общего белка до $45,7 \pm 5,15$ г/л ($64,0 \pm 3,97$ г/л, $p < 0,05$) соотношение альбуминов к глобулинам до $1,0 \pm 0,09$ ($1,5 \pm 0,15$, $p < 0,05$); возрастала доля α_1 - и β_2 -глобулинов и снижалась доля γ -глобулинов по сравнению с интактными животными (табл. 12).

Таблица 12

Процентное содержание белковых фракций в сыворотке крови крыс при введении CCl_4

Группы	Альбумины, %	Глобулины, %				
		α_1	α_2	β_1	β_2	γ
1. Контроль интактные (n=20)	$48,8 \pm 1,0$	$11,3 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,3$	$5,9 \pm 0,3$	$15,3 \pm 0,3$	$13,2 \pm 0,6$
2. Контроль CCl_4 (n=20)	$47,5 \pm 1,9$	$15,6 \pm 0,6$ $P_{1-2} < 0,05$	$6,0 \pm 1,2$	$5,97 \pm 0,5$	$18,0 \pm 0,5$ $P_{1-2} < 0,05$	$6,9 \pm 0,8$ $P_{1-2} < 0,05$
3. Карсил + CCl_4 (n=8)	$47,8 \pm 1,0$	$13,2 \pm 0,5$ $P_{3-4} < 0,05$	$5,5 \pm 0,5$	$8,4 \pm 0,1$	$17,0 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,8$
4. МХИБЭ20 + CCl_4 100мг (n=12)	$42,8 \pm 2,1$ $P_{3-4} < 0,05$	$16,0 \pm 0,6$	$8,35 \pm 1,2$	$6,5 \pm 0,5$	$16,2 \pm 0,6$ $P_{1-4} < 0,05$	$10,0 \pm 1,2$ $P_{2-4} < 0,05$

Примечание: Р - достоверность по сравнению с группами.

Предварительное введение карсила сохраняло содержание общего белка в норме $66,9 \pm 5,3$ г/л и снижало процентное содержание α_1 -глобулинов, введение МХИБЭ20 (100 мг/кг) снижало содержание β_2 -глобулинов и увеличивало содержание γ -глобулинов по сравнению с группой II (контроль CCl_4).

При введении CCl_4 активность АлТ повышалась в 3,3 раза по сравнению с интактной группой животных ($1,8 \pm 0,26$ и $0,55 \pm 0,05$ ммоль/л×ч соответственно, $p < 0,05$). В группе с профилактическим 5-ти кратным введением карсила активность АлТ в сыворотке незначительно снижалась по сравнению с группой II ($1,6 \pm 0,2$ и $1,8 \pm 0,26$ ммоль/л×ч соответственно). При предварительном 5-ти кратном введении МХИБЭ20 в дозе 100 мг/кг активность АлТ снижалась до $0,8 \pm 0,05$ ммоль/л×ч.

Активность в сыворотке ММП при введении тетрахлорметана возрастала до $252,0 \pm 11,8$ мкмоль/л×ч по сравнению с контролем ($190,4 \pm 11,3$ $p < 0,05$). На фоне профилактического введения карсила и МХИБЭ20 активность ММП в сыворотке крови снижалась и приближалась к показателям контроля (контроль - $190,4 \pm 11,3$; карсил + CCl_4 – $202,8 \pm 19,2$ мкмоль/л×ч, $p > 0,05$; МХИБЭ20 + CCl_4 – $200,3 \pm 12,2$ мкмоль/л×ч, $p > 0,05$).

Морфологическое исследование печени

Введение CCl_4 сопровождалось выраженными деструктивными изменениями в паренхиме печени крыс. Макроскопически печень у животных была тусклой, дряблой по консистенции. В

паренхиме печени преобладала вакуольная дистрофия гепатоцитов, вплоть до баллонной (44,1%). Плотность очагов некрозов встречались в различных отделах долек и были диссеминированными (38,7%). Полнокровие сосудов печени было неравномерным в сосудах триад, синусоидах и центральных венах. Нормальная ткань составляла 17,2%. Численная плотность двуядерных гепатоцитов превышала на 16% их плотности в контроле. В группе крыс с профилактическим введением МХИБЭ20 в дозе 100 мг/кг объемная плотность неповрежденной ткани в 1,6 раза была больше, а объемная плотность очагов некроза в 3,2 меньше аналогичных показателей в группе контроля CCl_4 . Полнокровие сосудов было неравномерным, встречалось в сосудах триад, синусоидах и центральных венах. Численная плотность двуядерных гепатоцитов в группе “МХИБЭ20+ CCl_4 ” превышала их плотность в группе контроль CCl_4 в 1,7 раз. По сравнению с карсилом профилактическое введение МХИБЭ20 увеличивало объемную плотность нормальной ткани в 2,9 раза.

В группе крыс с профилактическим введением КИБЭ20 в дозе 100 мг/кг обнаруживали вакуольную дистрофию гепатоцитов (84,9%), объемная плотность очагов некроза и неповрежденной ткани составили 8,1% и 6,9% соответственно. В группе с предварительным введением “карсил + CCl_4 ” объемные плотности дистрофически измененных гепатоцитов составляли 79,6% , очагов некрозов 11,09% и неповрежденной ткани 9,31%.

Профилактическое введение МХИБЭ20 в дозе 50 мг/кг сопровождалось увеличением объемной плотности дистрофий в 1,45, неповрежденной ткани и двуядерных гепатоцитов в 1,4 раза и уменьшением некрозов в 4 раза по сравнению с контролем CCl_4 . По сравнению с карсилом предварительное введение МХИБЭ20 в дозе 50 мг/кг сопровождалось увеличением объемной плотности неповрежденной ткани в 2,6 раза и двуядерных гепатоцитов в 1,5 раза. В группе животных с введением КИБЭ20 в дозе 50 мг/кг объемная плотность очагов некроза была в 1,9 раза меньше, объемная плотность неповрежденной ткани в 2 раза больше по сравнению с карсилом.

Данные морфометрического исследования подтверждают способность экстрактов бересты уменьшать повреждение печени тетрахлорметаном. На 4-е сутки после введения CCl_4 в условиях профилактического введения МХИБЭ20 в дозах 50 и 100 мг/кг объемная плотность очагов некрозов в печени снижалась более чем в 3 раза, предварительное введение КИБЭ20 сопровождалось уменьшением очагов некрозов более чем в 4 раза. При предварительном введении МХИБЭ20 на фоне снижения деструктивных процессов более чем в 2 раза увеличивается объемная плотность нормальной ткани по сравнению с профилактическим введением карсила. Увеличение объемной плотности нормальной ткани в условиях предварительного введения МХИБЭ20 в дозах 50 и 100 мг/кг сопровождается значительным увеличением численной плотности 2-ядерных гепатоцитов в 1,5 и 1,9 раза по сравнению с группой крыс, которым предварительно вводили карсил.

ВЫВОДЫ

1. В бересте *Betula pendula* и *Betula pubescens* установлено наличие первичных (аминокислоты, полисахариды) и вторичных метаболитов (тритерпеновые сапонины, полифенольные окисляемые соединения (дубильные вещества) преимущественно гидролизуемой группы, флавоноиды, кумарины, гидроксикоричные кислоты).

Показано, что береста *Betula pendula* по компонентному составу основных групп БАС (тритерпеновые сапонины, дубильные вещества, кумарины, гидроксикоричные кислоты) идентична бересте *Betula pubescens*, при этом отмечено, что качественный состав БАС остается постоянным, независимо от места произрастания растений и возраста бересты.

2. В бересте обоих видов *Betula pendula* и *Betula pubescens* идентифицированы в составе тритерпеновых сапонинов - бетулин; дубильных веществ – танин; кумаринов – кумарин; гидроксикоричных кислот – кислота хлорогеновая; аминокислот - метионин, треонин, фенилаланин, триптофан, лизин, орнитин, аланин, серин, пролин, кислота глутаминовая, кислота аспарагиновая, глутамин.

3. С помощью физико-химических и гравиметрических методов анализа тритерпеновых сапонинов бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens* выделен бетулин и подтверждена его структура. В зависимости от места произрастания содержание тритерпеновых сапонинов значительно варьирует (в Сибирском регионе от 18,0% до 31,0% и в Европейской части России от 18,0% до 36,0%).

Наибольшее содержание тритерпеновых сапонинов отмечено для образцов бересты *Betula pubescens*, произрастающей в Пермском крае.

4. Установлено, что механохимическая активация бересты приводит к изменению качественного состава кумаринов, гидроксикоричных кислот, аминокислот, а также способствует увеличению выхода большинства групп БАВ: тритерпеновых сапонинов, кумаринов, полифенольных окисляемых (дубильных) веществ и гидроксикоричных кислот.

Выявлено, что по составу макро- и микроэлементов (61 элемент) бересты оба вида *Betula pendula* и *Betula pubescens* различий не имеют. Механохимическая активация бересты приводит к увеличению содержания отдельных элементов в ней. Содержание токсичных элементов не превышает значения ПДК.

5. Оптимальными технологическими параметрами для получения экстракта бересты сухого являются: экстрагент – спирт этиловый 20%; размер частиц сырья – 3 мм; гидромодуль – 1:40; кратность экстракции – 3; продолжительность экстракции – 30 мин. Механохимическая активация бересты повышает % выхода основных групп БАС, в результате экстракт бересты *Betula sp.* сухой соответствует исходному сырью по составу основных групп БАС, но значительно превосходит по их удельному содержанию.

6. Экстракт бересты *Betula sp.* сухой обладает выраженными противовоспалительными и **гепатопротекторными** свойствами и является перспективным для дальнейших детальных фармакологических исследований.

7. Установлены микродиагностические признаки сырья *Betula pendula* и *Betula pubescens*, заключающиеся в структуре клеток пробки при поперечном и продольном сечении.

8. Разработанные параметры стандартизации сырья *Betula pendula* и *Betula pubescens* – «Береста *Betula sp.*» положены в основу проекта фармакопейной статьи «Березы повислой и березы пушистой береста – *Betulae pendulae* и *Betulae pubescens cortex betulinus*», в качестве средства, обладающего противовоспалительными свойствами и гепатопротекторной активностью при токсических повреждениях печени.

Практические рекомендации. Результаты диссертационной работы позволяют внедрить материалы диссертации в практику научных исследований и учебного процесса на кафедрах соответствующего профиля ряда образовательных учреждений высшего профессионального образования.

Перспектива дальнейшей разработки темы. Результаты диссертационной работы лягут в основу разработки импортзамещающих отечественных препаратов, обладающих противовоспалительной и гепатопротекторной активностью при различных повреждениях печени.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Элементный состав механохимически активированной бересты и сухого экстракта из нее [Электронный ресурс] / Ю.В. Лигостаева, В.В. Иванова, М.А. Ханина, А.П. Родин, А.В. Шишканова // **Медицина и образование в Сибири.** – Новосибирск: Электронное научное издание НГМУ, 2012. - №4.
2. Изучение гепатопротекторного действия растительного экстракта коры березы при экспериментальном гепатите, вызванном четыреххлористым углеродом [Электронный ресурс] / В.В. Иванова, Ю.В. Лигостаева, О.Н. Потеряева, Г.С. Русских, О.Р. Грек, В.И. Шарапов, М.М. Геворгян // **Фундаментальные исследования.** – Электронное научное издание, 2013. - №3-2. – С.277-279.
3. Фракции оксипролина в крови крыс в зависимости от режима введения тетрахлометана и карсила [Электронный ресурс] / В.В. Иванова, О.Р. Грек, Ю.В. Лигостаева, В.И. Шарапов, Е.Г. Юрина, Я.С. Серегеева, М.Л. Серебрякова, С.В. Мишенина // **Медицина и образование в Сибири.** – Новосибирск: Электронное научное издание НГМУ, 2014.- №1.
4. Гепатопротекторное действие водно-спиртового экстракта диспергированной бересты при остром отравлении парацетамолом [Электронный ресурс] / О.Р. Грек, В.В. Иванова, М. А. Карпов, Ю.В. Лигостаева, В.И. Шарапов, О. Н. Потеряева, А. В. Шишканова // **Медицина и образование в Сибири.** – Новосибирск: Электронное научное издание НГМУ, 2014.- №5.

5. Лигостаева, Ю. В. Аминокислоты бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens* [Электронный ресурс] / Ю. В. Лигостаева, М. А. Ханина, А. П. Родин // **Медицина и образование в Сибири.** – Новосибирск: Электронное научное издание НГМУ, 2015. – № 1.
6. Лигостаева, Ю.В. Влияние механохимической обработки на качественный состав и количественное содержание биологически активных веществ бересты / Ю.В. Лигостаева, М.А. Ханина // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы V Всероссийской конференции 24–26 апреля 2012 г. - Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2012. – С.185-187.
7. Лигостаева, Ю.В. Фармакогностическое изучение бересты *Betula pendula* Roth. / Ю.В. Лигостаева, В.В. Иванова // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии: материалы Российской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Современные проблемы фармацевтической науки», посвященной 75-летию ПГФА, 2012. – № 9. – С.190-192.
8. Лигостаева, Ю.В. Сорбция и десорбция биологически активных веществ на наноалмазах / Ю.В. Лигостаева, М.А. Ханина, И.С.Ларионова // Программы и тезисы докладов школы молодых ученых «Нанокarbonные и наноалмазные материалы в электромагнитных и биомедицинских приложениях. Современные способы коммерциализации научных разработок». – Новосибирск: ИНХ СО РАН, 2012. – С. 39-40.
9. Лигостаева, Ю.В. Фармакогностическое исследование бересты / Ю.В. Лигостаева // Материалы III Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Авиценна 2012», посвященной 110-летию со дня рождения Г.Д. Залесского. - Новосибирск: Сибмедииздат НГМУ, 2012. – С.557-558.
10. Лигостаева, Ю.В. Сорбция и десорбция биологически активных веществ бересты на наноалмазах и фармакогностическое исследование экстрактов из нее / Ю.В. Лигостаева, М.А. Ханина, И.С. Ларионова // Всероссийская научно-практическая конференция, с международным участием, посвященная 30-летию фармацевтического факультета Ярославской государственной медицинской академии «Инновационные процессы в лекарствоведении»: Сборник материалов (18-19 декабря 2012 года). – Ярославль: Аверс Плюс, 2012. – С. 200-205.
11. Лигостаева, Ю.В. Сравнительная характеристика гепатопротекторного действия растительных экстрактов при повреждении печени, вызванном парацетамолом / Н.В. Ткачева, О.Н. Огнева, Ю.В. Лигостаева // Материалы III Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Авиценна 2012», посвященной 110-летию со дня рождения Г.Д. Залесского. - Новосибирск: Сибмедииздат НГМУ, 2012. – С.593-594.
12. Лигостаева, Ю.В. Влияние механохимической активации на химический состав бересты/ Ю.В. Лигостаева // Аспирантские чтения 2013: Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Молодые ученые – медицине». – Самара: ООО «ЦПР», 2013. – С. 286-289.
13. Лигостаева, Ю.В. Фармакогностическое исследование бересты березы повислой и березы пушистой/ Ю.В. Лигостаева // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: Материалы 69-ой всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием, Екатеринбург, 9-10 апреля 2014 г. – Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2014. – С. 751-754.
14. Лигостаева, Ю.В., Ханина М.А. Сравнительное фармакогностическое исследование бересты распространенных видов берез / Ю.В. Лигостаева, М.А. Ханина // Всероссийская научно-методическая конференция с международным участием, посвященная 95-летию Иркутского государственного медицинского университета: сборник научно-методических трудов, Иркутск, 9-10 июня 2014 г.– Иркутск: Изд-во ИГМУ, 2014. – С. 104-105.