



2017 | Том / Volume V

№ 5

Научно-практический журнал
Scientific and Practical Journal

ISSN 2307-9266
e-ISSN 2413-2241

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

PHARMACY & PHARMACOLOGY



Обзоры, лекции

Reviews, Lectures

Фармакогнозия, ботаника

Pharmacognosy, Botany

Фармацевтическая технология и биотехнология

Pharmaceutical Technology
and Biotechnology

Фармацевтическая и токсикологическая химия

Pharmaceutical and Toxicological
Chemistry

Фармакология и клиническая фармакология

Pharmacology and Clinical
Pharmacology

Информационные технологии в фармации

Information Technologies in Pharmacy

Организация и экономика фармацевтического дела

Organization and Economy
of Pharmacy

Экономика и менеджмент медицины

Economy and Management
of Medicine

Фармацевтическое образование

Pharmaceutical Education

Краткие сообщения

Brief Reports

Дискуссии, рецензии, юбилеи, научные школы, история фармации и фармакологии

Discussions, Referee Reports,
Anniversaries, Schools
of Thought, History
of Pharmacy and
Pharmacology



ПМФИ
Филиал ВолгГМУ

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Научно-практический журнал
Периодичность 6 номеров в год
Том 5, Выпуск № 5, 2017

Свидетельство регистрации СМИ: ПИ № ФС77–67428 от 13.10.2016 г.

Главный редактор

Петров Владимир Иванович академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, г. Волгоград, Россия

Заместитель главного редактора

Озеров Александр Александрович доктор химических наук, профессор, г. Волгоград, Россия

Редакционная коллегия

Фармакогнозия, ботаника

Куркин Владимир Александрович доктор фармацевтических наук, профессор, г. Самара, Россия.

Зилфикаров Ифрат Назимович профессор РАН, доктор фармацевтических наук, г. Москва, Россия

Фармацевтическая технология и биотехнология

Саканян Елена Ивановна доктор фармацевтических наук, профессор, г. Москва, Россия

Фармацевтическая и токсикологическая химия / Информационные технологии в фармации

Вавер Ивона PhD, профессор, г. Варшава, Польша

Фармакология и клиническая фармакология

Ханферьян Роман Авакович доктор медицинских наук, профессор, г. Москва, Россия.

Буске Паскаль MD, профессор, г. Страсбург, Франция

Кампизи Коррадино профессор, MD, PhD, г. Генуя, Италия

Организация и экономика фармацевтического дела / Экономика и менеджмент медицины

Наркевич Игорь Анатольевич доктор фармацевтических наук, профессор, г. Санкт-Петербург, Россия

Сомасундарам Субраманиан MD, Россия/Индия

Статьи, представленные в разделы **Обзоры, лекции / Фармацевтическое образование / Краткие сообщения / Дискуссии, рецензии, юбилей, научные школы, история фармации и фармакологии** могут быть рассмотрены любыми членами редакционной коллегии.

Ответственный секретарь: Корянова Ксения Николаевна, кандидат фармацевтических наук, г. Пятигорск, Россия

Корректор: Санникова Евгения Геннадиевна, г. Пятигорск, Россия

Переводчик: Давыденко Любовь Григорьевна, кандидат филологических наук, доцент, г. Пятигорск, Россия

Адрес редакции: 357532, г. Пятигорск, пр-т Калинина, 11.

Пятигорский медико-фармацевтический институт –

филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

Телефон: +7 (8793) 32-44-74. E-mail: pharmjournal@mail.ru

Объединенный каталог. Пресса России. Газеты и журналы. Индекс 94183

Формат А4, тираж 1000 экз.

Журнал «Фармация и фармакология» включен в перечень рецензируемых научных изданий, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, и в соответствии с пунктом 5 правил формирования перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (Перечень ВАК), РИНЦ, eLibrary, ВИНТИ, РГБ, Киберленинка, Соционет, Chemical Abstracts (CAS), Directory of Open Access Journals (DOAJ), EBSCO Discovery Service, RNMJ, University of CAMBRIDGE, Ulrich'sWeb, Google Scholar, Biefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), Research Bible, Open Archives Initiative, Academic Keys, JournalTOCs, WorldCat, OpenAIRE, University of Oxford, The British Library, Universitait Gent, Université de Montréal, University of Saskatchewan.

Отпечатано в ООО «Рекламно-информационное агентство на Кавминводах»

357500, Ставропольский край, г. Пятигорск, ул. Февральская, 54

© ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный
медицинский университет» Минздрава России, 2017
© Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, 2017
© Авторы, 2017

ISSN 2307-9266
e-ISSN 2413-2241

PHARMACY & PHARMACOLOGY

Scientific and practical journal

Periodicity is 6 issues a year

Volume V, Issue N 5, 2017

The mass media registration certificate: ПИ № ФС77–67428 от 13.10.2016

Editor-in-Chief

Petrov Vladimir Ivanovich Academician RAS, PhD (Medicine), Professor, Volgograd, Russia

Deputy Editor-in-Chief

Ozerov Aleksandr Aleksandrovich PhD (Chemistry), Professor, Volgograd, Russia

Editorial Board

Pharmacognosy, Botany

Kurkin Vladimir Aleksandrovich PhD (Pharmacy), Professor, Samara, Russia

Zilfikarov Ifrat Nazimovich PhD (Pharmacy), Professor of the RAS, Moscow, Russia

Pharmaceutical Technology and Biotechnology

Sakanyan Elena Ivanovna PhD (Pharmacy), Professor, Moscow, Russia

Pharmaceutical and Toxicological Chemistry / Information Technologies in Pharmacy

Iwona Wawer PhD, Professor, Warsaw (Poland)

Pharmacology and Clinical Pharmacology

Khanfer`yan Roman Avakovich PhD (Medicine), Professor, Moscow, Russia

Pascal Bousquet MD, PhD Professor, Strasbourg, France

Campisi Corradino Professor, MD, PhD, Genoa, Italy

Organization and Economy of Pharmacy / Economy and Management of Medicine

Narkevich Igor Anatolyevich PhD (Pharmacy), Professor, Saint-Petersburg, Russia

Somasundaram Subramanian MD, Russia/India

Manuscripts presented in sections **Reviews, Lectures / Pharmaceutical Education / Brief Reports / Discussions, Referee Reports, Anniversaries, School of Thought, History of Pharmacy and Pharmacology** can be considered by any members of the editorial board.

Executive Editor: Koryanova Ksenia Nikolaevna, PhD (Pharmacy), Pyatigorsk, Russia

Proofreader: Sannikova Evgeniya Gennadiyevna, Pyatigorsk, Russia

Translator: Davydenko Lubov Grigoryevna, PhD (Philology), Associate Professor, Pyatigorsk, Russia

Editors office address: 357532, Pyatigorsk, Kalinina, 11.

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University

Phone number: +7(8793) 32-44-74. E-mail: pharmjournal@mail.ru

Union catalogue. Russian Press/ Newspapers and journals. Code 94183

A4 size, 1000 issues circulation.

Journal "Pharmacy & Pharmacology" is recommended International Committee Of Medical Journal Editors and included in Higher Attestation Commission, Russian citation database, eLibrary, ARISTI (All-Russian Institute of Scientific and Technical Information), RSL (Russian State Library), CyberLeninka, Socionet, Chemical Abstracts (CAS), Directory of Open Access Journals (DOAJ), EBSCO Discovery Service, RNMJ, University of CAMBRIDGE, Ulrich'sWeb, Google Scholar, Biefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), Research Bible, Open Archives Initiative, Academic Keys, JournalTOCs, WorldCat, OpenAIRE, University of Oxford, The British Library, Universitait Gent, Université de Montréal, University of Saskatchewan.

Printed in open company "Advertising and information Agency on the Caucasian mineral waters"
357500, Stavropol region, Pyatigorsk, St. February, 54

ISSN 2307-9266
e-ISSN 2413-2241

© Volgograd State Medical University, 2017
© Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute –
branch of Volgograd State Medical University, 2017
©Authors, 2017

**СОДЕРЖАНИЕ
CONTENTS**

Обзоры, лекции / Reviews, Lectures

<i>М.Е. Ким, К.Б. Мурзагулова, С.Б. Евсеева</i>	<i>M.E. Kim, K.B. Murzagulova, S.B. Evseeva</i>
ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИРОДНОГО СЫРЬЯ В СОСТАВЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ТУБЕРКУЛЕЗА: ОПЫТ НАРОДНОЙ МЕДИЦИНЫ, СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ.....404	POSSIBILITY OF NATURAL RAW MATERIALS USE IN THE FORMULATION OF ADJUVANT THERAPY OF TUBERCULOSIS: EXPERIENCE OF FOLK MEDICINE, MODERN STATE OF STUDIES404

<i>Е.Л. Салимова, А.Д. Конон, С.В. Петровский, В.П. Трухин, И.В. Красильников</i>	<i>E.L. Salimova, A.D. Konon, S.V. Petrovskii, V.P. Truhin, I.V. Krasilnikov</i>
---	--

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ НАЕМОФИЛУС ИНФЛУЕНЗАЕ ТИП В – ПРОДУЦЕНТОВ ПОЛИРИБОЗИЛРИБИТОЛФОСФАТА – ОСНОВНОГО КОМПОНЕНТА ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИН422	PECULIARITIES OF CULTIVATION OF HAEMOPHILUS INFLUENZAE TYPE B STRAINS – PRODUCERS OF POLYRIBOSYL RIBITOL PHOSPHATE – THE MAIN COMPONENT OF POLYSACCHARIDE VACCINES422
--	--

Фармацевтическая и токсикологическая химия / Pharmaceutical and Toxicological Chemistry

<i>С.Л. Аджиахметова, Л.П. Мыкоц, Н.М. Червонная, И.И. Харченко, Н.А. Туховская, Э.Т. Оганесян</i>	<i>S.L. Adjiahmetova, L.P. Myikots, N.M. Chervonnaya, I.I. Harchenko, N.A. Tuhovskaya, E.T. Oganessian</i>
ИЗУЧЕНИЕ РЕОЛОГИЧЕСКИХ И СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ ПЕКТИНСОДЕРЖАЩИХ РАСТВОРОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ РЯБИНИКА РЯБИНОЛИСТНОГО.....442	THE STUDY OF RHEOLOGICAL AND SORPTION PROPERTIES OF PECTINESTERASE SOLUTIONS FROM THE LEAVES OF SORBARIA SORBIFOLIA.....442

Фармакология, клиническая фармакология / Pharmacology and Clinical Pharmacology

<i>Ф.В. Гладких, В.Е. Студент, Н.Г. Степанюк, С.В. Вернигородский</i>	<i>F.V. Hladkykh, V.O. Student, N.H. Stepaniuk, S.V. Vernyhorodskyi</i>
ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И КОМПЬЮТЕРНОЕ ТОМОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИБУПРОФЕНА И ЕГО КОМБИНАЦИИ С 2-ФЕНИЛ-3-КАРБЕТОКСИ-4-ДИМЕТИЛАМИНО- МЕТИЛ-5-ОКСИБЕНЗОФУРАНА ГИДРОХЛОРИДОМ (ВИНБОРОНОМ) НА СОСТОЯНИЕ СУСТАВОВ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ.....457	PATHOMORPHOLOGICAL AND COMPUTERIZED TOMOGRAPHY STUDY OF IBUPROFEN AND COMBINATION WITH 2-PHENYL-3- CARBETHOXY-4-DIMETHYLAMINOMETHYL- 5-OXSIBENZOFURAN HYDROCHLORIDE (VINBORON) INFLUENCE ON THE JOINTS OF LOWER EXTREMITIES OF RATS WITH EXPERIMENTAL RHEUMATOID ARTHRITIS457

Информационные технологии в фармации / Informational Technologies in Pharmacy

<i>А.А. Глушко, А.С. Чиряпкин, В.С. Чиряпкин, А.М. Муртузалиева, Ю.А. Полковникова</i>	<i>A.A. Glushko, A.S. Chiriapkin, V.S. Chiriapkin, A.M. Murtuzalieva, Yu.A. Polkovnikova</i>
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ МОДЕЛИРОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С АКТИВНЫМ ЦЕНТРОМ АНГИОТЕНЗИН- ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА487	DEVELOPMENT OF METHODS OF SIMULATION OF THE INTERACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES WITH THE ACTIVE CENTER OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME.....487

Организация и экономика фармацевтического дела / Organization and Economy of Pharmacy

<i>И.В. Калинин, Т.И. Кабакова</i>	<i>I.V. Kalinin, T.I. Kabakova</i>
ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ В УЧРЕЖДЕНИЯХ УГОЛОВНО- ИСПОЛНИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ504	DRUG PROVISION OF HIV INFECTED CRIMINALS IN INSTITUTIONS OF CRIMINAL-EXECUTIVE SYSTEM OF KRASNODAR REGION504

УДК 616-002.5:615.32:615.89

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИРОДНОГО СЫРЬЯ В СОСТАВЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ТУБЕРКУЛЕЗА: ОПЫТ НАРОДНОЙ МЕДИЦИНЫ, СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

М.Е. Ким, К.Б. Мурзагулова, С.Б. Евсеева

ТОО «Фармацевтическая компания Ромат», 140000, Республика Казахстан,
Павлодарская область, г. Павлодар, ул. Камзина, 33
E-mail: sbevseeva@yandex.ru

Признаки роста распространенности туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, низкая результативность терапии говорят об острой необходимости решения задач, направленных на повышение эффективности лечения; снижение токсичности и побочного действия противотуберкулезных лекарственных препаратов, обеспечение хорошей переносимости и непрерывности химиотерапии; снятие симптомов интоксикации, связанных с действием возбудителя на организм, улучшение качества жизни больных в период терапии и ремиссии. **Цель:** изучение сведений народной медицины, данных научных исследований, касающихся использования сырья природного происхождения (растительного, животного и минерального) во вспомогательной терапии туберкулеза. **Материалы и методы.** Исследование проводилось с использованием информационно-поисковых и библиотечных баз данных (PubMed, eLIBRARY, Cyberleninka), технической информации производителей БАД к пище, а также материалы сайтов, посвященные использованию растительного, животного и минерального сырья в народной медицине. **Результаты и обсуждение.** Выявлено, что вспомогательная терапия туберкулеза включает в себя средства природного происхождения: растительного, животного и минерального. Как показывают данные исследований, применение фитотерапии направлено на усиление диуреза, обеспечивающего выведение токсичных веществ и их метаболитов, а также снижения общего уровня токсинов; усиление антиоксидантной защиты организма, и в частности печени, компенсацию усиленного потребления витаминов, аминокислот и микроэлементов печенью, активно метаболизирующей ксенобиотики, а также повышение общей устойчивости организма. Биологически активные вещества растений, в частности эфирные масла, полиацетилены, алкалоиды обладают специфической антимикробной активностью в отношении микобактерий туберкулеза. Схожую функцию выполняет сырье животного происхождения, являющееся источником витаминов, аминокислот, микроэлементов. Отмечается также перспективность использования минерального сырья природного происхождения во вспомогательной терапии туберкулеза. **Заключение.** Таким образом, вспомогательная терапия туберкулеза включает в себя средства природного происхождения: растительного, животного и минерального, эффективность использования которых подтверждается лабораторными и клиническими исследованиями.

Ключевые слова: туберкулез, средства природного происхождения, растительное сырье, сырье животного происхождения, минеральное сырье

Для цитирования:

Ким М.Е., Мурзагулова К.Б., Евсеева С.Б.
ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИРОДНОГО
СЫРЬЯ В СОСТАВЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ
ТУБЕРКУЛЕЗА: ОПЫТ НАРОДНОЙ МЕДИЦИНЫ,
СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ.
Фармация и фармакология. 2017;5(5):404-421.
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-404-421
© Ким М.Е., Мурзагулова К.Б., Евсеева С.Б., 2017.

For citation:

Kim M.E., Murzagulova K.B., Evseeva S.B.
POSSIBILITY OF NATURAL RAW MATERIALS USE
IN THE FORMULATION OF ADJUVANT THERAPY OF
TUBERCULOSIS: EXPERIENCE OF FOLK MEDICINE,
MODERN STATE OF STUDIES.
Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(5):404-421. (In Russ.)
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-404-421

POSSIBILITY OF NATURAL RAW MATERIALS USE IN THE FORMULATION OF ADJUVANT THERAPY OF TUBERCULOSIS: EXPERIENCE OF FOLK MEDICINE, MODERN STATE OF STUDIES

M.E. Kim, K.B. Murzagulova, S.B. Evseeva

“Pharmaceutical Company “Romat” LLP,
33, Kamzin Str., Pavlodar, Kazakhstan, 140000
E-mail: sbevseeva@yandex.ru

The signs of growth in the prevalence of multidrug-resistant tuberculosis, low effectiveness of therapy indicate the urgent need to solve problems aimed at the improvement of the effectiveness of treatment: the reduction of toxicity and side effects of anti-tuberculosis drugs, the provision of good tolerability and continuity of chemotherapy; the removal of symptoms of intoxication associated with the action of the pathogen on the body, the improvement of the quality of life of patients during therapy and remission. The **aim** of the investigation is to study the data of folk medicine, scientific research data concerning the use of raw materials of natural (vegetable, animal and mineral) origin in the adjuvant therapy of tuberculosis. **Materials and methods.** The study was carried out using information retrieval and library databases (PubMed, eLIBRARY, Cyberleninka), technical information of manufacturers of dietary supplements to food, as well as site materials dedicated to the use of vegetable, animal and mineral raw materials in folk medicine. **Results and discussion.** The adjuvant therapy of tuberculosis includes remedies of natural origin: vegetable, animal and mineral ones. According to the research data, the use of phytotherapy is aimed at enhancing diuresis, which ensures the elimination of toxic substances and their metabolites, as well as the decrease of the overall level of toxins; the strengthening of the body's antioxidant defense, and liver specificity, the compensation for the increased consumption of vitamins, amino acids and microelements by the liver, which actively metabolizes xenobiotics, as well as the increase of the body's overall resistance. A long-term benefit of using natural mineral raw materials in adjuvant therapy of tuberculosis is also observed. **Conclusion.** Thus, adjuvant therapy of tuberculosis includes the use of raw materials of natural (vegetable, animal and mineral) origin, the effectiveness of which is confirmed by laboratory and clinical studies.

Keywords: tuberculosis, remedies of natural origin, vegetable raw materials, raw materials of animal origin, mineral raw materials

Введение. Распространенность туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, низкая эффективность лечения говорят об острой необходимости решения задач, направленных на повышение результативности лечения; снижение токсичности и побочного действия фармацевтических противотуберкулезных препаратов, обеспечение хорошей переносимости и непрерывности химиотерапии; снятие симптомов интоксикации, связанных с действием возбудителя на организм, улучшение качества жизни больных в период терапии и ремиссии.

Патогенетическая терапия больных туберкулезом является одним из компонентов комплексного лечения больных туберкулезом и направлена на повышение его эффективности за счет применения средств, воздействующих не на возбудителя заболевания, а на состояние различных систем организма больного туберкулезом. Обязательным условием назначения любого метода патогенетической терапии является применение его на фоне проводимой специфической химиотерапии. В зависимости от того, на каком этапе лечения больного туберкулезом назначается патогенетическая терапия, она может воздействовать на процессы прогрессирования с целью коррекции нарушений или на процессы для восстановления структур организма, которые были утрачены в результате патологического процесса. Группы препара-

тов патогенетического воздействия, рекомендуемые к использованию при химиотерапии туберкулеза в соответствии с показаниями, включают иммуностимулирующие, дезинтоксикационные, противовоспалительные, десенсибилизирующие, антиоксидантные, витаминные средства [1].

Интерес представляют средства природного происхождения, которые имеют длительный опыт использования в народной медицине и обладают минимальными побочными эффектами [2].

Цель исследования – изучение сведений народной медицины, данных научных исследований, касающихся использования сырья природного происхождения (растительного, животного и минерального) во вспомогательной терапии туберкулеза.

Материалы и методы. Исследование проводилось с использованием информационно-поисковых (PubMed), библиотечных баз данных (eLibrary, Cyberleninka), технической информации производителей БАД к пище, а также материалы сайтов, посвященные использованию растительного, животного и минерального сырья в народной медицине.

Результаты и обсуждение. Традиционно в народной медицине на территории России для лечения туберкулеза использовались продукты животного (мед и другие продукты пчеловодства, животные жиры, кумыс и т.д.) и растительного происхождения.

В настоящее время они в большей степени применяются для вспомогательной терапии. Лекарственное растительное сырье используется в виде настоев и отваров для повышения защитных функций организма (алоэ, чага), витаминные (шиповник, крапива, череды, первоцвет), в качестве кровоостанавливающих (хвощ, пырей, крапива, лапчатка, горец змеиный, буквица лекарственная), отхаркивающих (мать-и-мачеха, солодка, шалфей, алтей), противомикробных

(сосна, можжевельник, эвкалипт, шалфей, чеснок, береза, чабрец) средств, а также для уменьшения потливости (шалфей, иссоп). Для повышения защитных сил организма также применяются мед и прополис, который используется и для ингаляций в качестве антимикробного средства [3–7]. Наряду с монокомпонентными извлечениями находят применение также сборы растительного сырья, в частности, представленные в таблице 1 [4, 5].

Таблица 1 – Сборы растительного сырья для лечения туберкулеза, народная медицина

Состав сбора	Способ применения
Плоды можжевельника, трава хвоща, трава спорыша	Настой
Трава тысячелистника, лист шалфея, плоды аниса	Отвар
Трава спорыша, корень солодки	Настой
Лист крапивы, корень крапивы	Настой
Лист пустырника, корень цикория	Настой
Корни лапчатки, корни змеевика, трава полыни, вахты трехлистной, горца почечуйного	Настой
Зверобой, пустырник, крапива, хвощ, тысячелистник, шалфей, подорожник, береза, календула	Настой
Первоцвет, горец птичий, хвощ, пикульник обыкновенный	Настой
Цветки и листья мать-и-мачехи, корень солодки, трава горца птичьего, трава медуницы, трава хвоща полевого, трава шалфея	Настой в термосе

На рынке БАД к пище и пищевой продукции присутствуют сборы растительные и с продуктами животного происхождения, использование которых в те-

рапии туберкулеза основано на опыте традиционной медицины, как заявляют производители. В таблице 2 представлены сборы растительного сырья [8–10].

Таблица 2 – БАД к пище в виде сборов лекарственного растительного сырья, предлагаемые к применению при туберкулезе

Наименование, производитель	Состав	Заявленное действие
Сбор №57 (сбор при туберкулезе легких), «Травы Кавказа», г. Горячий ключ	Трава медуницы, чабреца, пастушьей сумки, хвоща, спорыша, плоды можжевельника, фенхеля, цветки девясилы, мох исландский, почки тополя, березы, корни алтея, девясилы, дягиля, солодки	Бактерицидное, противовоспалительное, отхаркивающее, иммуномодулирующее
Сбор №48 (при туберкулезе легких), ТМ «Мариславна», г. Майкоп	Корни алтея, девясилы, солодки, лист березы, грецкого ореха, мать-и-мачехи, шалфея, эвкалипта, почки черного тополя, трава багульника, зверобоя, золотарника, тысячелистника, хвоща, чабреца, цветы липы	Противовоспалительное, противовирусное, бронхолитическое действие
Сбор трав 3 «Туберкулез легких», ИП Трутнева О.А., г. Бийск	Астра алтайская, буквица лекарственная, герань луговая, дурнишник обыкновенный, девясил высокий (корень), дербенник иволистный, купальница азиатская, полынь Гмелина, орех маньчжурский лист, синяк обыкновенный, скабиоза бледно-желтая, шизонепета многонадрезная	Очищающее дыхательные пути, противовоспалительное
«Туберкулез легких» травяной чай, «Целебные травы Северного Кавказа», г. Майкоп	Трава тысячелистника, зверобоя, золото-тысячника, мать-и-мачехи, репешка, топиамбура, цветки бессмертника, календулы, корни девясилы, солодки, окопника, лист шалфея	Противовоспалительное, кровоочистительное, противомикробное, противовирусное действие

БАД к пище на основе сырья животного происхождения, рекомендуемые производителями для при-

менения при туберкулезе, представлены в таблице 3 [6, 7].

Таблица 3 – БАД к пище на основе сырья животного происхождения, рекомендуемые производителями для применения при туберкулезе

Наименование, производитель	Состав	Заявленное действие
Galleria melonella-бронхо сироп, ООО ПК «Элсервис», Алтайский край	Экстракт восковой моли, мать-и-мачехи, сахарный сироп	Муколитическое
Гомогенат личинок восковой моли адсорбированный сухой, ООО «Мелмур», Сочи	Личинки восковой моли, лактоза, фруктоза	Действие на возбудителя туберкулеза
Настойка экскрементов личинок восковой моли, ООО «Мелмур», Сочи	Экскременты личинок восковой моли, спирт этиловый	Действие на возбудителя туберкулеза и иммунную систему
Настойка личинок восковой моли, ООО «Мелмур», Сочи	Личинки восковой моли, спирт этиловый	Действие на возбудителя туберкулеза и иммунную систему
Панторин (сухой порошок пантов марала, вспомогательные вещества), ООО «Фармпродукт»	Сухой порошок пантов марала, вспомогательные вещества	Общеукрепляющее, источник аминокислот и микроэлементов

Эффективность использования многих видов природного сырья доказана научными исследованиями. Так, фитотерапия, как вспомогательный компонент, в лечении туберкулеза может быть использована при нарушениях функционального состояния печени, побочных реакциях на химиопрепараты, недостаточной эффективности традиционной химиотерапии, при нарушениях в системе крови и угнетении иммунного статуса. Использование фитотерапии способствует усилению диуреза, обеспечивающего выведение токсичных веществ и их метаболитов, снижению общего уровня токсинов; усилению антиоксидантной защиты печени [11–15].

Например, О.Д. Барнауловым с соавторами по результатам изучения фармакологических свойств водных извлечений растений на различных лабораторных животных предложена схема для разработки противотуберкулезных сборов. В ее основе лежит применение компонентов, действие которых направлено на устранение причины заболевания, уменьшение патогенетических изменений и усиление защитных, компенсаторно-приспособительных сил организма. Таким образом, в сборы включаются лекарственные растения, характеризующиеся антимикробной, противовоспалительной, секретолитической, иммуномодулирующей, ускоряющей процессы регенерации и детоксикационной активностью [11].

Антимикробным действием в отношении микобактерий туберкулеза обладают, по обобщенным данным, следующие группы биологически активных веществ растений: флавоноиды, кумарины, хромоны, простые фенолы, хиноны, алкалоиды, терпеноиды и др. [16, 17]

Имеются данные о том, что фалькаринол и фалькариндиол (полиацетиленовые соединения), известные как фитоалексины томатов, моркови, проявляют противотуберкулезные свойства. Они ак-

тивно подавляют рост *Mycobacterium spp.*, включая *Mycobacterium tuberculosis* [16, 18].

Исследования установили выраженную противотуберкулезную активность эфирных масел череды поникшей и полыни метельчатой, содержащих в качестве основных компонентов ароматические полиацетиленовые соединения: капиллен и капиллин в эфирном масле полыни метельчатой, а фенилгептатрин в эфирном масле череды поникшей [18].

Имеются данные о наличии у прополиса антимикробных свойств в отношении *Mycobacterium tuberculosis* [19].

В исследованиях установлено, что выраженным антибактериальным действием *in vitro* в отношении чувствительных и устойчивых к противотуберкулезным препаратам штаммам микобактерий туберкулеза обладает экстракт смеси лишайников рода цетрарии и рода кладонии за счет наличия ароматических фенолов [20].

Доказана противотуберкулезная активность эфирных масел полыни австрийской, полыни сантониновой, тысячелистника широколопастного, полыни однолетней. Определение чувствительности микобактерий туберкулёза к образцам испытуемого эфирного масла полыни однолетней проводилось в сравнении со стандартными противотуберкулезными препаратами. Как показали экспериментальные данные, эфирное масло полыни однолетней проявляет противотуберкулезную активность (пороговая концентрация 20 мг/мл) на уровне официальных противотуберкулезных препаратов (рифампицин, протионамид) [21, 22].

Учеными Республики Казахстан проводились исследования антимикробной активности эфирных масел растений флоры Казахстана (полынь Филатова, полынь Сиверса, аяния кустарничковая, почки тополя и др.) [23–25]. Имеются данные клинических

исследований, подтверждающие эффективность ингаляционного применения препарата «Эферол» (20% спиртовой раствор эфирного масла полыни гладкой) у больных, имеющих выраженные симптомы интоксикации с кашлем и выделением слизисто-гнойной мокроты, стойким бактериовыделением и деструктивными формами туберкулеза. Выявлено, что после проведенного курса лечения бактериовыделение в 1-й группе, получавшей ингаляции препарата «Эферол», прекратилось в 91,8±3,9% случаях. В тоже время у больных 2-ой группы (без вспомогательной терапии «Эферолом») прекращение бактериовыделения отмечено в 73,3±6,6% случаях [26, 27].

Имеются данные исследований антимикробной активности экстрактов и эфирного масла чеснока в отношении микобактерий туберкулеза. Установлено, что экстракты чеснока, обогащенные аллином и аджоеном, обладают антибактериальной активностью сопоставимой с активностью препаратов сравнения – противотуберкулезных лекарственных средств. При этом экстракт, содержащий аллицин, превосходил по активности препараты сравнения – изониазид и этамбутол, а аджоем, содержащий экстракт, был сопоставим с ними. Масло чеснока также обладало антибактериальной активностью, но в гораздо более высоких концентрациях, чем препараты сравнения [28].

В исследованиях доказано антимикробное действие гексановой фракции надземной части крапивы двудомной и кассии софера в отношении лекарственно-устойчивых микобактерий и микобактерий, изолированных из клинического материала [29].

Учеными АГУ проводились исследования влияния экстрактов растений Астраханской области на микобактерии туберкулеза. Наиболее высокий ингибирующий эффект зарегистрирован у водно-спиртового экстракта из корня солодки по отношению *Mycobacterium tuberculosis* (H37RV) [30].

Использование гепатопротекторов при лечении туберкулеза является актуальным, исходя из специфики протекания самого заболевания и токсичности используемых химиотерапевтических средств. Наиболее частый побочный эффект противотуберкулезных препаратов – это токсическое воздействие на печень (44,9% пациентов). Наряду с использованием препаратов гепатопротекторов (гептрал, эссенциале и др.), рассматривается возможность использования препаратов лекарственного растительного сырья и продуктов животного происхождения [12, 14].

Кроме того, в литературе имеется достаточное количество сведений о наличии гепатопротекторной активности у следующих видов лекарственного растительного сырья: овса посевного, верблюжьей колючки, «Лимонидин» (субстанция на основе кермека Гмелина), володушки золотистой, индивидуальных флавоноидов (дигидрокверцетина, кверцетина, рутина), пижмы обыкновенной, бархата амурского [31–33].

О.Д. Барнауловым с соавторами в состав проти-

вотуберкулезных сборов предложено включать в качестве гепатопротекторов куркуму, солодку, аралию, лимонник, элеутерококк, имбирь, зверобой, ромашку, череду, шалфей [11].

Имеются данные клинических исследований, подтверждающие перспективность применения в комплексной терапии туберкулеза «Розобтина» (корни и корневища девясила, трава золототысячника, плоды боярышника, плоды шиповника, цветки пижмы обыкновенной). По заявлению исследователей, сбор обладает гепатопротекторным действием. На фоне его приема у больных отмечалась положительная динамика клинических симптомов, подтвержденная клинико-лабораторными исследованиями [34].

Эффективность применения гомеопатического средства «Галстена» у больных туберкулезом доказана в результате лабораторных и клинических исследований. Показано, что препарат проявляет гепатопротекторные и антиоксидантные свойства. Использование его при туберкулезе способствует уменьшению клинических и лабораторных признаков лекарственного повреждения печени при туберкулезе [31].

У больных лекарственно-устойчивым туберкулезом существенно повышены показатели активности перекисного окисления липидов по сравнению со здоровыми людьми. Поэтому отмечается необходимость раннего назначения антиоксидантных средств. Наиболее выраженными антиоксидантными свойствами обладают полифенолы (флавоноиды, дубильные вещества) растений. В качестве потенциальных антиоксидантов, по данным литературы, можно рассматривать следующие виды лекарственного растительного сырья: крапива двудомная, солодка голая, шлемник байкальский, хвощ полевой, кермек Гмелина, а также экстракты прополиса и личинок большой восковой моли [15, 33, 35–38].

В борьбе с возбудителем при туберкулезе существенное значение имеет клеточный иммунитет, в частности, бактерицидная система макрофагов, элиминирующих микобактерии. К подавлению клеточного иммунитета приводит размножение в организме микобактерий туберкулеза, поступление в биологические жидкости и ткани их антигенов, высвобождение компонентов поврежденных клеток хозяина, метаболитов. С учетом этого при выборе вспомогательной терапии уделяется поиск средств для коррекции нарушений иммунитета [15, 39].

В качестве примера можно привести исследования влияния на иммунитет экстракта корня солодки на лабораторных животных. Установлено, что введение *per os* мышам, предварительно зараженным *Mycobacterium tuberculosis*, H37Rv, экстракта корня солодки голой в дозе 0,2 мг/кг в брюшную полость способствовало достоверному повышению функциональной активности перитонеальных макрофагов по показателям поглотительной способности и повышению активности бактерицидной системы фагоцитов – миелопероксидазной системы [40].

Имеются данные исследований, свидетельствующие, что настойка «Гретавоск» (на основе личинок огневки пчелиной) оказывает стимулирующее влияние на функциональную активность Т-лимфоцитов. Показатель гиперчувствительности замедленного типа опытной группы мышей, которая получала раствор лиофилизированного порошка трутневого расплода в дозе 100 мг/кг, составил 9,91 против 6,53 у контрольных животных, т.е. лиофилизированный порошок стимулирует функциональную активность Т-лимфоцитов, усиливая продукцию сенсibilизированными лимфоцитами медиаторов, сопровождающих клеточные реакции замедленного типа [41].

В результате клинических исследований отмечалось, что включение комбинации: мед пчелиный и прополисное масло, животные жиры, фитоконпоненты, масло пихты, чеснок, витаминный сбор, цветочная пыльца в комплексную терапию больных туберкулезом легких сопровождается увеличением общего числа лимфоцитов. Применение комбинации совместно со стандартной терапией позволило добиться положительной рентгенологической динамики – рассасывание инфильтрата, закрытие полости распада зарегистрировано в 87% случаев, отсутствие динамики – в 13%, причем у всех исследуемых пациентов прекратилось выделение микобактерий с мокротой [14].

Как было отмечено, при лечении заболеваний дыхательных путей и легких, особенно при длительном течении заболевания, значение имеет вспомогательная детоксицирующая терапия. В лечении заболеваний верхних дыхательных путей после интенсивных курсов медикаментозной терапии рекомендуется назначение лекарственного растительного сырья: листья крапивы, корни лопуха, трава хвоща, корни одуванчика, листья березы). Пектины и инулин, присутствующие, в том числе, в подземной части растениях семейства астровые (одуванчик лекарственный, виды лопуха, девясил высокий), характеризуется высокой комплексообразующей способностью, что дает возможность использовать их в качестве детоксицирующих средств в комплексной терапии туберкулеза [42–45].

Противотуберкулезные препараты подвергаются в печени биотрансформации – ферментному превращению исходных химических веществ в неактивные и легковыводимые из организма соединения. Биотрансформация является каскадным процессом, в котором одновременно или поочередно участвуют многие ферменты и белки организма. Как правило, процесс происходит в три этапа: фаза модификации, фаза детоксикации, фаза выведения и в каждой фазе участвуют специфические системы ферментов. Для функционирования системы детоксикации требуется наличие многих веществ: аскорбаты, токоферолы, минеральные вещества, витамины и другие [11, 46].

Основным условием функционирования системы детоксикации является достаточное поступление в организм белка, полноценного по своему аминокис-

лотному составу для восполнения пула ферментов. С этих позиций возможно объяснение традиционного использования во вспомогательной терапии туберкулеза продуктов пчеловодства: цветочной пыльцы, перги, прополиса, маточного молочка, личинок восковой моли, пчелиного подмора, являющихся дополнительным источником аминокислот [47, 48].

При туберкулезе развивается выраженный дефицит и дисбаланс отдельных витаминов, в частности аскорбиновой кислоты. Дефицит аскорбиновой кислоты выражен больше в фазе распада. При всех клинических формах активного туберкулеза отмечается также недостаток витамина В₂ (рибофлавина), фиксируется низкое его содержание в крови. У больных туберкулезом легких нарушается также обмен витамина В₁ – тиамин и возникает его дефицит. В исследованиях зарубежных авторов отмечается необходимость компенсации недостатка витамина А при данном заболевании [15, 49].

Для коррекции витаминной недостаточности в сборы для лечения туберкулеза включается лекарственное растительное сырье – источник поливитаминов: плоды шиповника, калины, рябины, листья крапивы. Такой подход к лечению туберкулеза характерен и для народной медицины [4, 5, 11, 43].

В качестве источника витаминов может рассматриваться и сырье животного происхождения, используемое для вспомогательной терапии туберкулеза: продукты пчеловодства, животные жиры, кумыс. В состав прополиса помимо аминокислот, флавоноидов, оксикоричных кислот, смолистых веществ, эфирных масел, входят витамины (В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, А, Е), минеральные вещества (калий, кальций, фосфор, магний, железо, сера, цинк и др.). Витамины содержатся в пыльце (витамины группы В, А, Е, D, К), в перге – витамины (А, В₁, В₂, С, D, Е, К). В маточном молочке представлены в основном водорастворимые витамины группы В, а также витамины С, Н [48, 49].

В последнее время внимание исследователей привлекает роль микроэлементов в комплексной терапии туберкулеза [50–53].

Так, кремний необходим для нормального функционирования соединительной ткани легких, желез внутренней секреции. В ряде исследований отмечается роль кремния как необходимого компонента вспомогательной терапии туберкулеза. Имеется ряд работ, посвященный поискам растительных источников кремния. В результате анализа содержания кремния в сырье установлено, что в качестве таковых может использоваться хвощ полевой, крапива двудомная, горец птичий, тысячелистник обыкновенный, девясил высокий. Это согласуется с практикой использования данных растений при туберкулезе легких, особенно при кровохаркании, в народной медицине [54, 55].

Известно более 70 цинкпротеидов, многие из которых являются металлоферментами (ДНК- и РНК-полимераза, тимидинкиназа и др.), играющими важную роль в метаболизме нуклеиновых кислот и белка. Цинк выполняет роль антиоксиданта в соста-

ве ферментов супероксиддисмутаза, предотвращает взаимодействие с более агрессивными тяжелыми металлами, связываясь с редокс-активными участками. Цинк также выполняет роль регулятора металлопротеиназ, которые играют роль антирадикальной защиты. Цинк является элементом, принимающим участие в пролиферации, дифференцировке, созревании и активации лимфоцитов, участвующих в гуморальном и клеточном иммунитете. Результаты исследований показали пониженный уровень содержания в сыворотке цинка и селена у больных туберкулезом в сравнении с группой контроля, в которую входили незараженные люди [52, 53, 56–58].

В клинических исследованиях показана эффективность использования сочетания витамина А с цинком (цинка сульфат) в комплексной терапии туберкулеза: отмечена конверсия мазка [50].

У больных туберкулезом проявляется анемия. И у патогенных микроорганизмов, и в организме человека имеются белки, основной функцией которых является связывание и мобилизация железа для нужд различных жизненно важных биохимических реакций. В исследованиях установлено положительное влияние противотуберкулезной терапии на анемию воспаления, однако мультифакторная анемия и железодефицитная анемия воспаления могут сохраняться на фоне терапии противотуберкулезными препаратами [59].

Наибольший интерес представляет содержание кальция, так как его ионы активируют действие многих ферментов, способствуют свертыванию крови, регулируют проницаемость клеточных мембран. Высокое содержание кальция по данным исследований отмечается в траве люцерны посевной, тысячелистника, горца птичьего и корнях солодки (содержат до 25% кальция от массы сухого вещества). Традиционно источником кальция являются природные минеральные соли [3, 51, 59, 60].

В качестве источников микроэлементов можно рассматривать такие виды природного сырья, как мумие, панты, продукты пчеловодства (личинки восковой моли и продукты их жизнедеятельности) [48, 60].

В последнее время рассматривается возможность использования наночастиц микро- и макроэлементов для использования во вспомогательной терапии туберкулеза, полученных методами «зеленой химии» на основе экстрактов лекарственного растительного сырья [61].

Одной из перспективных групп средств природного происхождения являются комплексы с анаболическим, адаптогенным и тонизирующим действием, применение которых актуально при заболеваниях, сопровождающихся нарушением белкового обмена,

общим истощением организма, нарушением компенсаторных и адаптационных процессов, в частности при туберкулезе [11, 62].

В качестве источников выступает сырье как животного, так и растительного происхождения, содержащее экдистероиды. Наличием экдистероидов (экдизон, 20-гидроксиэкдизон) можно объяснить использование при туберкулезе БАД, на основе личинок большой восковой моли. Помимо мембраностабилизирующего, адаптогенного и анаболического действия, одним из эффектов является усиление репаративной регенерации печени при токсическом гепатите и стимуляция эритропоэза в условиях экспериментальной анемии [62–65].

Имеются данные клинических исследований комплексного лечения туберкулеза легких препаратом «Экдифит» – экстракт серпухи венценосной, обладающего анаболическим, адаптогенным и тонизирующим свойством. После приема препарата у больных отмечалось улучшение общего состояния, прибавка в весе. Использование препарата «Экдифит» у больных также способствовало нарастанию концентрации белка в крови. Отмечалась положительная рентгенологическая динамика в виде частичного рассасывания, уплотнения инфильтрации и уменьшения и закрытия полости распада в основной группе у 86% больных, в контрольной группе у 75% больных. На фоне приема препарата в основной группе отмечалось прекращение бактериовыделения у 84,0% больных (в контрольной группе у 70,0%) [64].

Заключение. Таким образом, вспомогательная терапия туберкулеза включает в себя средства природного происхождения: растительного, животного и минерального. Как показывают данные исследований, применение фитотерапии направлено на усиление диуреза, обеспечивающего выведение токсичных веществ и их метаболитов, а также снижения общего уровня токсинов; усиление антиоксидантной защиты организма, и в частности печени, компенсацию усиленного потребления витаминов, аминокислот и микроэлементов печенью, активно метаболизирующей ксенобиотики, а также повышение общей устойчивости организма. Биологически активные вещества растений, в частности эфирные масла, полиацетилены, алкалоиды обладают специфической антимикробной активностью в отношении микобактерий туберкулеза. Схожую функцию выполняет сырье животного происхождения, являющееся источником витаминов, аминокислот, микроэлементов, а также экдистероидов. Отмечается также перспективность использования минерального сырья природного происхождения во вспомогательной терапии туберкулеза.

Introduction. The prevalence of multidrug-resistant tuberculosis, the low effectiveness of treatment indicate the urgent need to solve problems aimed at the increase of the effectiveness of treatment; the reduction of toxicity and side effects of pharmaceutical antituberculosis drugs, the provision of good tolerability and continuity of

chemotherapy; the removal of symptoms of intoxication associated with the action of the pathogen on the body, the improvement of the quality of life of patients during therapy and remission.

Pathogenetic therapy of tuberculosis patients is one of the components of complex treatment of tuberculo-

sis patients and it is aimed at increasing its effectiveness through the use of agents that affect not the causative agent of the disease, but the state of various body systems of the patient with tuberculosis. An obligatory condition for the prescription of any method of pathogenetic therapy is its use against the background of specific chemotherapy. Depending on the stage of treatment of a tuberculosis patient, pathogenetic therapy is prescribed, it can influence the progression processes with the aim of correcting disorders or processes for the restoration of body structures that were lost as a result of the pathological process. Product groups of pathogenetic action, recommended for use in chemotherapy for tuberculosis, in accordance with the indications, include immunostimulating, detoxifying, anti-inflammatory, desensitizing, antioxidant, vitamin drugs [1].

Remedies of natural origin, which have a long experience in folk medicine and have minimal side effects are of interest [2].

The **aim** of the investigation is to study the data of folk medicine, research data regarding the use of raw materials of natural (vegetable, animal and mineral) origin in adjuvant therapy of tuberculosis.

Materials and methods. The research was carried out using information retrieval (*PubMed*), library data-

bases (*eLibrary*, *Cyberleninka*), technical information of manufacturers of dietary supplements to food, as well as site materials dedicated to the use of vegetable, animal and mineral raw materials in folk medicine.

Results and discussion. Products of animal origin (honey and other products of beekeeping, animal fats, koumiss, etc.) and of vegetable origin have been used to treat tuberculosis, traditionally, in the folk medicine in Russia. At present, they are more used in adjuvant therapy. Medicinal plant raw materials are used in the form of liquors and broths to enhance the protective functions of the body (*Aloe*, *Inonotus*), vitamins (*Rosa*, *Urtica*, *Bidens*, *Primula*), as hemostatic (*Equisetum*, *Elytrigia*, *Urtica*, *Potentilla*, *Polygonum bistorta* L., *Betonica officinalis* L.), expectorants (*Tussilago farfara* L., *Glycyrrhiza*, *Salvia*, *Althaea*), antimicrobial agents (*Pinus*, *Juniperus*, *Eucalyptus*, *Salvia*, *Allium sativum* L., *Betula*, *Thymus*), and also to reduce sweating (*Salvia*, *Hyssopus officinalis* L.). Honey and propolis are used to increase the protective forces of the body, propolis is also used for inhalations as an antimicrobial agent [3–7].

Along with monocomponent extracts, teas of raw material of vegetable origin are also used. Some of them are presented in Table 1 [4, 5].

Table 1 – Teas of vegetable raw materials for the treatment of tuberculosis, folk medicine

Formulation of a tea	Route of administration
Fruits of Juniper, herb of <i>Equisetum</i> , herb of <i>Polygonum aviculare</i> L.	Infusion
Herb of <i>Achillea millefolium</i> L., leaves of <i>Salvia</i> , fruits of <i>Anisum</i>	Decoction
Herb of <i>Polygonum aviculare</i> L., roots of <i>Glycyrrhiza</i>	Infusion
Leaves of <i>Urtica</i> , roots of <i>Urtica</i>	Infusion
Leaves of <i>Leonurus</i> , roots of <i>Cichorium intybus</i> L.	Infusion
Roots of <i>Potentilla</i> , roots of <i>Polygonum bistorta</i> L., herb of <i>Artemisia</i> , <i>Menyanthes trifoliata</i> L., <i>Polygonum persicaria</i> L.	Infusion
<i>Hypericum perforatum</i> L., <i>Leonurus</i> , <i>Urtica</i> , <i>Equisetum</i> , <i>Equisetum</i> , <i>Salvia</i> , <i>Plantago</i> , <i>Betula</i> , <i>Calendula</i>	Infusion
<i>Primula</i> , <i>Polygonum aviculare</i> L., <i>Equisetum</i> , <i>Galeopsis tetrahit</i> L.	Infusion
Blooms and leaves of <i>Tussilago farfara</i> L., root of <i>Glycyrrhiza</i> , herb of <i>Polygonum aviculare</i> L., herb of <i>Pulmonaria</i> , herb of common <i>Equisetum</i> , herb of <i>Salvia</i>	Infusion in vacuum flask

There are plants teas and products of animal origin, whose use in the therapy of tuberculosis is based on the experience of folk medicine, as their producers say, in the

market of dietary supplements to food and food products. Table 2 presents teas of raw materials of vegetable origin [8–10].

Table 2 – Dietary supplements in the form of teas made of medicinal plant raw materials, recommended for tuberculosis

Name, producer	Formulation	Declared effect
Tea No. 57 (tea of pulmonary tuberculosis), «Herbs of the Caucasus», Hot spring town	Herb of <i>Pulmonaria</i> , <i>Thymus</i> , <i>Bursae pastoris</i> , <i>Equisetum</i> , <i>Polygonum aviculare</i> L., fruits of <i>Juniperus</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> Mill., flowers of <i>Inula helenium</i> L., <i>Cetraria islandica</i> Ach., buds of <i>Populus</i> , <i>Betula</i> , roots of <i>Althea</i> , <i>Inula</i> , <i>Angelica</i> , <i>Glycyrrhiza</i>	Bactericidal, anti-inflammatory, expectorant, immunomodulating
Tea No. 48 (pulmonary tuberculosis), “Marislavna” trade name, Maikop town	Roots of <i>Althea</i> , <i>Inula</i> , <i>Glycyrrhiza</i> , leaves of <i>Betula</i> , <i>Jugans regia</i> L., <i>Tussilago farfara</i> L., <i>Salvia</i> , <i>Eucalyptus</i> , buds of <i>Populus nigra</i> , herb of <i>Ledum palustre</i> L., <i>Hypericum</i> , <i>Solidago</i> , <i>Achillea millefolium</i> , <i>Equisetum</i> , <i>Thymus</i> , flowers of <i>Tilia</i>	Anti-inflammatory, antiviral, broncholytic action

Table 2 continued

Tea of herbs No. 3 “Pulmonary tuberculosis”, O.A. Trutneva self- employed entrepreneur, Biysk town	Aster sibiricus, Betonica officinalis L., Geranium pratense L., Geranium pratense L., Xanthium strumarium L., Inula helenium L. (root), Lythrum salicaria L., Trollius asiaticus, Artemisia gmelinii Webb ex Stechmann, Juglans mandshurica Maxim. (leaf), Echium vulgare L., Scabiosa ochroleuca L., Schizonepeta multifida (L.) Briq.	Cleaning the respiratory tract, anti-inflammatory effect
Pulmonary tuberculosis herbal tea, Healing herbs of North Caucasus, Maikop town	Herb of Achillea millefolium L., Hypericum, Centaurium umbellatum Gilib., Tussilago farfara L., Agrimonia eupatoria L., Helianthus tuberosus L., flowers of Helichrysum arenarium (L.) Moench., Calendula, roots of Inula, Glycyrrhiza, Symphitum, leaves of salvia	Anti-inflammatory, hemocathartic, anti- infective, antiviral effect

Dietary supplements to food based on raw materials of animal origin, recommended by manufacturers for use in tuberculosis are presented in Table 3 [6, 7].

Table 3 – Dietary supplements to food based on raw materials of animal origin, recommended by manufacturers for use in tuberculosis

Name, producer	Formulation	Declared effect
Galleria mellonella-broncho syrup, PC «Elservis» LLC, Altai Territory	Extract of Galleria mellonella L., Tussilago farfara L., sugar syrup	Mucolytic
Homogenate of larva of bee moth, adsorbed, dry, «Melmour» LLC, Sochi city	Larva of Galleria mellonella L., lactose, fructose	Action on the causative agent of tuberculosis
Liquor of excrement of bee moth larva, «Melmour» LLC, Sochi city	Excrement of Galleria mellonella L. larva, ethyl alcohol	Action on the causative agent of tuberculosis, immunomodulating
Liquor of bee moth larva, «Melmour» LLC, Sochi city	Larva of Galleria mellonella L., ethyl alcohol	Action on the causative agent of tuberculosis, immunomodulating
Pantorin (dry powder of antlers of young Siberian stags, auxiliary substances), «Pharm-product» LLC	Dry powder of antlers of young Siberian stags, auxiliary substances	Tonic, source of aminoacids and microelements

The effectiveness of using many types of natural raw materials is proved by scientific research. Thus, phytotherapy as an auxiliary component in the treatment of tuberculosis can be used for violations of the functional state of the liver, adverse reactions to chemotherapeutic agents, insufficient effectiveness of traditional chemotherapy, for violations in the blood system and suppression of immune status. The use of phytotherapy contributes to the intensification of diuresis, ensuring the removal of toxic substances and their metabolites, the reduction of the overall level of toxins; the increase of the antioxidant defense of the liver. [11–15].

For example, Barnaulov O.D. et al. proposed a scheme for the development of anti-tuberculosis teas based on the results of studying the pharmacological properties of aquatic extracts of plants on various laboratory animals. It is based on the use of components the action of which is aimed at eliminating the cause of the disease, reducing pathogenetic changes and strengthening the protective, compensatory-adaptive forces of the body. Thus, the teas include medicinal plants characterized by antimicrobial, anti-inflammatory, secretory, immunomodulating activity, accelerating regeneration processes and detoxification activity [11].

According to the generalized data, the following groups of plant biologically active substances: flavonoids, coumarins, chromones, simple phenols, quinones,

alkaloids, terpenoids, etc. [16, 17] have antimicrobial action against mycobacteria tuberculosis.

There is evidence that falkarinol and falkarindiol (polyacetylene compounds) known as phytoalexins of tomatoes, carrots, show antituberculous properties. They actively suppress the growth of *Mycobacterium spp.*, including *M. tuberculosis* [16, 18].

The studies have established an intense anti-tuberculosis activity of ether oils of *Artemisia scoparia* Waldst. & Kit. and *Bidens cernua* L., containing aromatic polyacetylene compounds as main components: capillen and capillin in the ether oil of *Artemisia scoparia* Waldst. & Kit., and phenylheptatriene in the ether oil of the *Bidens cernua* L. [18].

There is evidence of the presence of antimicrobial properties in propolis against *Mycobacterium tuberculosis* [19].

It is found in studies that due to the presence of aromatic phenols an extract of a mixture of lichens of the *Cetraria* and *Cladonia* has an intense antibacterial effect *in vitro* on susceptible and resistant strains of mycobacteria tuberculosis [20].

The anti-tuberculosis activity of ether oils of *Artemisia austriaca* Jacq., *Artemisia santonica* L., *Achillea latiloba* Ledeb., *Artemisia annua* L. is proved. The sensitivity determination of mycobacteria tuberculosis to the samples of the test ether oil of *Artemisia annua* L. was compared with standard antituberculosis drugs. As

shown by experimental data, ether oil of *Artemisia annua* L. exhibits anti-tuberculosis activity (threshold concentration is 20 mg / ml) at the level of official anti-tuberculosis drugs (rifampicin, protionamide) [21, 22].

Scientists of the Republic of Kazakhstan conducted research of the antimicrobial activity of the plant ether oils of the flora of Kazakhstan (*Artemisia Filatova*, *Artemisia sieversiana* Ehrh. ex Willd., *Ajania fruticulosa* (Ledeb.) Poljakov, *Populus buds*, etc.) [23–25]. There are data from clinical studies confirming the effectiveness of inhalation application of “Eferol” drug (20% alcohol solution of ether oil of *Artemisia glabella* Kar. et Kir) in patients with severe symptoms of intoxication with cough and excretion of mucopurulent sputum, persistent bacterial excretion and destructive forms of tuberculosis. It was revealed that bacterioexcretion in the 1st group receiving inhalation of the drug “Eferol”, ceased in $91.8 \pm 3.9\%$ of cases after the treatment course. At the same time, the termination of bacterioexcretion was noted in $73.3 \pm 6.6\%$ cases [26, 27] in patients of the 2nd group (without adjuvant therapy by “Eferol”).

There are research data on the antimicrobial activity of extracts and ether oil of *Allium sativum* L. against mycobacteria tuberculosis. It has been established that garlic extracts, enriched with allein and ajoen, have antibacterial activity comparable with the activity of reference drugs – antituberculous drugs. In this case, the allicin-containing extract was superior to the reference drugs – isoniazid and ethambutol in activity, and the ajoen-containing extract was comparable to them. Garlic oil also had antibacterial activity, but at much higher concentrations than reference drugs [28].

In the studies, the antimicrobial effect of the hexane fraction of the overground part of the *Urtica dioica* L. of and *Cassia sophora* Linn was proved with respect to drug-resistant mycobacteria and mycobacteria, isolated from clinical material [29].

Scientists of ASU conducted research on the effect of plant extracts in the Astrakhan region on mycobacterium tuberculosis. The highest inhibitory effect was recorded in the aqueous alcoholic extract from the root of *Glycyrrhiza* against *M. tuberculosis* (H37RV) [30].

The use of hepatoprotectors in the treatment of tuberculosis is crucial because of the specific course of the disease itself and the toxicity of the chemotherapeutic agents used. The most frequent side effect of antituberculosis drugs is the toxic effect on the liver (44.9% of patients). Along with the use of hepatoprotective preparations (Heptral, Essentiale, etc.), opportunities of using medicinal raw material of vegetable origin and products of animal origin are under consideration [12, 14].

Besides, there is a sufficient amount of information in the literature on the presence of hepatoprotective activity in the following types of medicinal plant material: common oat, camel's thorn, “Limonidine” (a substance based on *Limonium Gmelinii* (Willd.) Kuntze), *Bupleurum aureum* Fisch. ex Hoffm., individual flavonoids (dihydroquercetin, quercetin, rutin), *Tanacetum vulgare* L., *Phellodendron amurense* Rupr. [31–33].

Barnaulov O.D. et al. proposed to include *Curcuma longa* L., *Glycyrrhiza glabra* L., *Aralia elata* (Miq.) Seem., *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill., *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim., *Zingiber officinale* Roscoe, *Hypericum perforatum* L., *Matricaria chamomilla* L., *Bidens tripartita* L., *Salvia officinalis* L. as hepatoprotectors into anti-tuberculosis teas [11].

There are data from clinical studies confirming the application perspectiveness in “Rosobtin” tuberculosis complex therapy (roots and rhizomes of *Inula*, herb of *Centaurium*, fruits of *Crataegus*, *Rosa*, flowers of *Tanacetum*). According to the researchers, the tea has a hepatoprotective effect. Alongside its administration, patients showed a positive dynamics of clinical symptoms, confirmed by clinical and laboratory studies [34].

The effectiveness of the use of “Galstena” homeopathic remedy in tuberculosis patients is proved as a result of laboratory and clinical studies. It is proved that the drug shows hepatoprotective and antioxidant properties. Its use in tuberculosis contributes to clinical and laboratory signs of drug-induced liver damage [31].

Lipid peroxidation activity was significantly increased in patients with drug-resistant tuberculosis in comparison with healthy people. Therefore, the need for early administration of antioxidant agents is noted. Polyphenols (flavonoids, tannins) of plants have the most intense antioxidant properties. As potential antioxidants, according to the literature, the following types of medicinal plant material can be considered: antioxidant activity was found in bur beggar-ticks, *Urtica dioica*, *Glycyrrhiza glabra* L., *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Equisetum arvense* L., *Limonium Gmelinii*, and also extracts of propolis and larva of *Galleria mellonella* L. [15, 33, 35–38].

The cellular immunity, in particular, the bactericidal system of macrophages that eliminate mycobacteria, in the fight against the pathogen in tuberculosis, is of great importance. The multiplication of mycobacterium tuberculosis in the body, the entry of their antigens into biological fluids and tissues, the excretion of components of damaged host cells, metabolites, cause the suppression of cellular immunity. Taking this into account, when choosing an adjuvant therapy, a search to find means for correcting immunity disorders is made [15, 39].

As an example, we can study the effect of *Glycyrrhiza* root extract on the immunity of laboratory animals. It has been established that the administration of *Glycyrrhiza* root extract, *per os*, at the dose of 0.2 mg / kg in the abdominal cavity, to mice preliminarily infected with *M. tuberculosis*, H37Rv, significantly increased the functional activity of peritoneal macrophages in terms of absorbent capacity and increased activity of the bactericidal phagocyte system - myeloperoxidase system [40].

There are data from studies showing that the “Gretavosk” liquor (based on larva of greater wax moth) has a stimulating effect on the functional activity of T-lymphocytes. The indicator of the delayed-type hypersensitivity of the test group of mice that received a solution of lyophilized powder of male bee brood at the dose of 100 mg / kg was 9.91 vs. 6.53 in control animals, i.e.

lyophilized powder stimulates the functional activity of T-lymphocytes, enhancing the production of mediators by sensitized lymphocytes that accompany delayed-type cellular reactions [41].

As a result of clinical studies, it was noted that the inclusion of combination (bee honey and propolis oil, animal fats, phyto-components, fir oil, garlic, vitamin tea, pollen) in complex therapy of patients with pulmonary tuberculosis is accompanied by an increase in the total number of lymphocytes. The use of combination with standard therapy allowed to achieve positive radiologic dynamics – resorption of the infiltrate, closure of the decay cavity was registered in 87% of cases, absence of dynamics – in 13%, and the excretion of mycobacteria with sputum ceased in all studied patients [14].

As it was noted, the adjuvant detoxification therapy is crucial in the treatment of diseases of the respiratory tract and lungs, especially in the long course of the disease. The prescription of medicinal plants (the leaves of *Urtica dioica* L., the roots of *Arctium*, herb of *Equisetum arvense* L., the roots of *Taraxacum officinale* Wigg., the leaves of *Betula*) is recommended in the treatment of diseases of the upper respiratory tract after intensive courses of drug therapy. Pectins and inulin, which are present, including in the underground part of *Asteraceae* plant family (*Taraxacum officinale* Wigg., *Arctium*, *Inula helenium* L.), are characterized by a high complexing ability, which makes it possible to use them as detoxifying agents in the complex therapy of tuberculosis [42–45].

Antituberculous drugs are exposed to biotransformation in the liver – the enzymatic conversion of the original chemicals into inactive and easily removable compounds from the body. Biotransformation is a cascade process in which many enzymes and proteins of the body take part simultaneously or alternately. As a rule, the process occurs in three stages: the phase of modification, the phase of detoxification, the phase of excretion, and specific enzyme systems take part in each phase. The presence of many substances – ascorbates, tocopherols, minerals, vitamins and others – are required for functioning of the detoxification system [11, 46].

The main condition for functioning of the detoxification system is a sufficient intake of a protein in the body that is proper in its amino acid composition for replenishing the pool of enzymes. From these positions, the traditional use of beekeeping products such as flower pollen, bee bread, propolis, royal jelly, larva of bee moth, dead bees, which are an additional source of amino acids, in adjuvant therapy of tuberculosis can be explained [47, 48].

An intense deficit and imbalance of individual vitamins, in particular ascorbic acid, develop in tuberculosis. The deficit of ascorbic acid is greater in the phase of decay. A deficiency of vitamin B2 (riboflavin) is also noted – its low content in the blood is fixed in all clinical forms of active tuberculosis. The exchange of vitamin B1-thiamine is also disturbed and its deficiency arises in patients with pulmonary tuberculosis. It is noted in studies of foreign authors, that there is a need to compensate for the lack of vitamin A in this disease [15, 49].

Medicinal plant raw materials, a source of multivitamins (fruits of *Rosa*, *Viburnum opulus* L., *Sorbus aucuparia* L., leaves of *Urtica dioica* L.) are included in teas for the treatment of tuberculosis to correct vitamin deficiency. This approach to the treatment of tuberculosis is also characteristic of folk medicine [4, 5, 11, 43].

Raw materials of animal origin, used in adjuvant therapy of tuberculosis (bee products, animal fats, koumiss) can be considered as a source of vitamins. In addition to amino acids, flavonoids, oxycinnamic acids, tar acids, ether oils, propolis contains vitamins (B1, B2, B3, B5, B6, A, E), minerals (potassium, calcium, phosphorus, magnesium, iron, sulfur, zinc, etc.). Vitamins are contained in pollen (vitamins B, A, E, D, K), in bee bread (vitamins A, B1, B2, C, D, E, K). Mainly water-soluble vitamins of group B, as well as vitamins C, H are presented in royal jelly [48, 49].

Lately, the role of microelements in the complex therapy of tuberculosis has been attracting the attention of researchers [50–53].

So, silicon is necessary for normal functioning of the connective tissue of the lungs, glands of internal secretion. A number of studies have noted the role of silicon as an essential component of tuberculosis adjuvant therapy. There are a number of reports devoted to the search for plant sources of silicon. As a result of the analysis of the content of silicon in the raw materials it has been established that *Equisetum arvense* L., *Urtica dioica* L., *Polygonum aviculare* L., *Achillea millefolium* L., *Inula helenium* L. can be used as sources of silicon. This is consistent with the practice of using these plants for pulmonary tuberculosis, especially hemoptysis, in folk medicine [54, 55].

More than 70 zinc-proteins are known, many of which are metal-enzymes (DNA and RNA polymerase, thymidine kinase, etc.), which play an important role in the metabolism of nucleic acids and protein. Zinc acts as an antioxidant in the enzymes of superoxide dismutase, prevents interaction with more aggressive heavy metals, and binds to redox-active sites. Zinc also acts as a regulator of metalloproteinases, which play the role of anti-radical protection. Zinc is an element that takes part in proliferation, differentiation, maturation and activation of lymphocytes involved in humoral and cellular immunity. The results of the studies showed a reduced level of zinc and selenium in serum in patients with tuberculosis in comparison with the control group, which included uninfected people [52, 53, 56–58].

Clinical studies show the effectiveness of using a combination of vitamin A and zinc (zinc sulfate) in the complex therapy of tuberculosis: smear conversion was noted [50].

Anemia appears in patients with tuberculosis. Both pathogenic microorganisms and the human body have proteins, the main function of which is binding and mobilization of iron for the needs of various vital biochemical reactions. A positive effect of antituberculosis therapy on the anemia of inflammation has been established in studies, however, multifactorial anemia and iron deficiency

anemia of inflammation may persist in addition to antituberculous drugs [59].

The content of calcium is of greatest interest, since its ions activate the action of many enzymes, promote blood clotting, regulate the permeability of cell membranes. High calcium content is noted in the herb of *Medicago sativa* L., *Polygonum aviculare* L. and roots of *Glycyrrhiza* (contain up to 25% calcium by weight of dry substance). Traditionally, the source of calcium is natural mineral salts [3, 51, 59, 60].

As sources of microelements, it is possible to consider such types of natural raw materials as moommiyo, antlers, bee products (larva of *Galleria mellonella* L. and products of its vital activity) [48, 60].

Recently, the possibility of using nanoparticles of micro- and macro-elements for the use in tuberculosis adjuvant therapy, obtained by the methods of "green chemistry" on the basis of extracts of medicinal plant raw materials, has been considered [61].

One of the promising groups of remedies of natural origin are complexes with anabolic, adaptogenic and tonic effect, the use of which is actual in diseases accompanied by a violation of protein metabolism, general exhaustion of the organism, violation of compensatory and adaptive processes, in particular in tuberculosis [11, 62].

Raw materials of animal and vegetable origin, containing ecdysteroids act as sources. The use of dietary supplements, based on the larvae of a large bee moth in tuberculosis can be explained by the presence of ecdysteroids (ecdysone, 20-hydroxyecdysone (ecdysterone)). In addition to membrane-stabilizing, adaptogenic and anabolic effects, one of the effects is the enhancement of reparative liver regeneration in toxic hepatitis and the

stimulation of erythropoiesis in experimental anemia [62–65].

There are data from clinical studies of "Ekdifit" drug (extract of *Serratula coronata* L., having anabolic, adaptogenic and toning property) in the complex treatment of pulmonary tuberculosis. After taking the drug by patients, there was improvement in the general condition, an increase in weight. The use of "Ekdifit" drug also contributed to the increase of protein concentration in the blood of patients. Positive X-ray dynamics was observed in the form of partial resorption, densification of infiltration and reduction and closure of the decay cavity in the main group in 86% of patients, in the control group in 75% of patients. In addition to taking the drug in the main group, there was a termination of bacterial excretion in 84.0% of patients (in the control group in 70.0%) [64].

Conclusion. Thus, the adjuvant therapy of tuberculosis includes remedies of natural origin: vegetable, animal and mineral ones. According to the research data, the use of phytotherapy is aimed at enhancing diuresis, which ensures the elimination of toxic substances and its metabolites, as well as the reduction of the overall level of toxins; strengthening of the body's antioxidant defense, and liver specificity, compensating for the increased consumption of vitamins, amino acids and micro elements by the liver, which actively metabolizes xenobiotics, as well as increases the body's overall resistance. Biologically active substances of plants in particular ether oils, polyacetylenes, alkaloids have specific antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. A similar function is performed by raw materials of animal origin, which is a source of vitamins, amino acids, micro elements, and ecdysteroids. There is also a perspective of using natural mineral raw materials in tuberculosis adjuvant therapy.

Библиографический список

1. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания. 2014. Москва, 56 с.
2. Стратегия ВОЗ в области народной медицины. 2014–2023. Всемирная организация здравоохранения, 2013 г. 80 с.
3. Федько И.В. Перспектива использования растений народной медицины при фитотерапии туберкулеза легких // Вестник ТГПУ. 2013. 8 (136) С. 210–212.
4. Корзунова А. Очищение и восстановление организма народными средствами после туберкулеза. М., 2013. 160 с.
5. ЗАО «Галант». URL: <http://tuberculum.ru/> (дата обращения: 02.08.2017).
6. ООО «Мелмур». URL: <http://www.melmur.ru/katalog-tovarov/pcheloproducty.html> (дата обращения: 02.08.2017).
7. Медконфитюр. URL: https://www.med-konfitur.ru/catalog/melmur_1/ (дата обращения: 02.08.2017).
8. Фитолaborатория Мариславна. URL: <http://marislavna.ru/o-nas/> (дата обращения: 02.08.2017).
9. Травы Кавказа. URL: <http://www.greenph.ru/> (дата обращения: 02.08.2017).
10. Фитоаптека «Алтаймикс». URL: <http://altaymix.ru/catalog/fitochai.html> (дата обращения: 02.08.2017).
11. Барнаулов О.Д., Барнаулов А.О., Поспелова М.Л. Сбор для лечения туберкулеза легких // Патент 2411954. Россия, А61К 36/00/. №2009112475/15; Заявл.03.04.2009; Опубл. 20.02.2011; Бюл. № 5. URL: <http://www.findpatent.ru/patent/241/2411954.html> (дата обращения: 02.08.2017).
12. Мархаев А.Г., Убеева И.П., Бадлеева М.В. Возможности фитотерапии в коррекции гепатотоксических эффектов при химиотерапии туберкулеза // Бюллетень ВШЦ СО РАМН. 2010. №2 (72). С. 67–70.
13. Михеева Н.В., Татаринцева М.П., Иванова О.Г., Тараник И.Н., Мартынова Г.Г., Степочкина С.П. Применение экстракта пихты в комплексном лечении больных туберкулезом органов дыхания // Сибирское медицинское обозрение. 2011. №6. URL: <http://cyberleninka.ru/article/n/primenenie-ekstrakta-pihty-v-kompleksnom-lechenii-bolnyh-tuberkulezom-organov-dyhaniya> (дата обращения: 05.08.2017).
14. Макеев О.Г., Короткое А.В., Бураев М.Э., Гисматов Р.Х., Костюкова С.В. Применение комплекса факторов растительного происхождения для лечения больных туберкулезом легких // Вестник уральской медицинской академической науки. 2010. №2. С. 95–97.

15. Гельберг И.С., Вольф С.Б., Алексю Е.Н., Авласенко В.С., Шевчук Д.В., Кроткова Е.Н., Мойсеенок А.Г., Наумов А.В. Нарушения резистентности, метаболизма при туберкулезе и методы патогенетического воздействия в его комплексном лечении // Журнал ГрГМУ. 2009. № 1. С. 123–128.
16. Коновалов Д.А. Природные полиацетиленовые соединения // Фармация и фармакология. 2014. №4 (5). С. 23–47.
17. Ramachandran Sarojini Santhosh, Balasubramanian Suriyanarayanan. Plants: a source for new antimycobacterial drugs // Planta Med. 2014. 80(01). P. 9–21. DOI: 10.1055/s-0033-1350978
18. Насухова А.М., Оробинская В.Н., Коновалов Д.А., Кузьмина У.А., Шханукова З.Х. Природные полиацетиленовые соединения с противотуберкулезной активностью // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016. Т. 11. №4. С. 595–599.
19. Laïd Boukraâ, Fatiha Abdellah, Leïla Ait-Abderrahim. Antimicrobial properties of bee products and medicinal plants // Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. URL: <http://www.formatex.info/microbiology4/vol2.html> (дата обращения: 20.05.2017)
20. Филиппова Г.В., Павлов Н.Г., Шашурин М.М., Кершенгольц Б.М. Влияние экстрактов слоевищ северных лишайников, экстрагированных различными способами, на биологические свойства микобактерий туберкулеза // Сибирский медицинский журнал. 2008. №3. С. 99–103.
21. Коновалов Д.А., Хамилонов А.А. Биологически активные соединения полыни однолетней. Эфирное масло // Фармация и фармакология. 2016. №4(4). С. 4–33. DOI:10.19163/2307-9266-2016-4-4-33
22. Коновалов Ю.Б., Коновалов Д.А. Противотуберкулезная активность эфирного масла полыни австрийской // Научное обозрение. 2005. №3. С. 13–15.
23. Новикова Н.М. Противотуберкулезная активность эфирных масел, выделенных из полыней флоры Казахстана // Медицина и экология. 2012. №2. С. 104–105.
24. Сейдахметова Р.Б., Бейсенбаева А.А., Атажанова Г.А., Сулейменов Е.М., Пак Р.Н., Кулыясов А.Т., Адекенов С.М. Химический состав и биологическая активность полыни гладкой // Химико-фармацевтический журнал. 2002. №3. С. 27–30.
25. Бондаренко Р.А., Поляков В.В., Лопухин Н.С. Способ получения эфирного масла почек тополя бальзамического, обладающего противотуберкулезной активностью // Патент 26566 РК. Оpubл. 25.12.2012. URL: <http://kzpatents.com/> (дата обращения: 20.05.2017).
26. Инструкция по применению лекарственного средства для специалистов «Эферол», утвержденная приказом Председателя Комитета Фармации Минздрава РК № 139 от 08.08.07.
27. Сейдахметова Р.Б., Пак Р.Н., Рахимов К.Д. Эферол – средство для лечения патологии дыхательных путей // Фундам. пробл. фармакол: сборник тезисов 2-го съезда Российского научного общества фармакологов. М., 2003. 148 с.
28. Viswanathan V., Phadatar A.G., Mukne A. Antimycobacterial and antibacterial activity of Allium sativum Bulbs. // Indian J Pharm Sci. 2014. No. 76 (3). P. 256–61.
29. Singh R., Hussain S., Verma R., Sharma P. Anti-mycobacterial screening of five Indian medicinal plants and partial purification of active extracts of Cassia sophera and Urtica dioica // Asian Pac J Trop Med. 2013. No. 5. P. 366–371. DOI: 10.1016/S1995-7645(13)60040-1.
30. Назарова Г.Н., Сухенко Л.Т., Маслов А.К. Влияние экстрактов некоторых растений Астраханской области на клетки микобактерий туберкулеза // Вестник новых медицинских технологий. 2007. Т. XIV. №4. С. 44.
31. Katikova O.Iu., Asanov B.M., Vize-Khripunova M.A., Burba E.N., Ruzov V.I. Use of the plant hepatoprotector Galstena tuberculostatics-induced hepatic lesions: experimental and clinical study // Probl Tuberk. 2002. No. 4. P. 32–36.
32. Коломиец Н.Э., Шейкин В.В., Ратькин А.В., Бондарчук Р.А. Гепатопротекторные свойства хвоща полевого // Фармация. 2005. №4. С. 38–40.
33. Жусупова Г.Е., Шалахметова Т.М., Мурзахметова М.К., Гадецкая А.В., Жусупова А.И. Антиоксидантная активность некоторых препаратов, полученных на основе растений Казахстана // Вестник Новосибирского государственного педагогического университета. 2013. №5 (15). С. 43–65. URL: <http://www.vestnik.nspu.ru/> (дата обращения: 20.05.2017)
34. Мархаев А.Г., Убеева И.П., Бадлеева М.В. Гепатопротекторное действие розобтина при лечении туберкулеза // Вестник Бурятского государственного университета. 2009. №12. С. 10–12.
35. Молодцов И.А., Альгина А.С. Активность перекисного окисления липидов как обоснование назначения антиоксидантов в комплексной терапии туберкулеза // Вятский медицинский вестник. 2009. №1. С. 59.
36. Кароматов И.Д. Солодка, лакричник, лакрица – применение в медицине (обзор литературы). 2013. №11-2. С. 230–235.
37. Шикова Ю.В., Лиходед В.А., Фархутдинов Р.Р., Симонян Е.В., Баймурзина Ю.Л., Епифанова А.В., Нэвед Силва А.Г., Петрова В.В., Елова Е.В. Влияние продуктов пчеловодства на процесс образования активных форм кислорода возможность их применения в составе лекарственных средств // Медицинский вестник Башкортостана. 2013. Т. 8. №6. С. 151–153.
38. Бурашева Г.Ш., Рахимов К.Д., Абилов Ж.А. Химико-технологические особенности биологически активного комплекса из верблюжьей колючки киргизской (Alhagi kirgisorum schrenk) // Доклады национальной академии наук Республики Казахстан. 2012. №2.
39. Мезенцева М.В., Стаханов В.А., Захарова М.В., Зотова И.Ф., Шаповал И.М., Трегубова М.И., Руссу Л.И. Перспективы иммунотерапии в комплексном лечении инфильтративного туберкулеза легких // Биопрепараты: профилактика, диагностика, лечение. 2011. №2(42). С. 20–25.
40. Маслов А.К., Назарова Г.Н., Сухенко Л.Т. Влияние экстракта из корня солодки на функциональную актив-

- ность перитонеальных макрофагов мышей, зараженных внутрибрюшинно микобактериями туберкулеза // Вестник новых медицинских технологий. 2008. Т. XV. №4. С. 212–213.
41. Богуцкая Е.Е., Тихонов А.И., Яковлева Л.В. Результаты изучения иммуотропного действия новых лекарственных средств из продуктов пчеловодства // Вестник фармации. 2015. №2. С. 73–79.
42. Бузук Г.Н., Эльяшевич Е.Г. Фармакогностическая характеристика хвоща полевого *Equisetum arvense* L. Обзор литературы // Вестник фармации. 2010. №2(48). С. 65–73.
43. Барнаулов О.Д. Введение в фитотерапию. СПб, 1999. 158 с.
44. Зяблицева Н.С., Белоусова А.Л., Компанцев В.А., Кисиева М.Т. Возможности использования топинамбура в медицинских целях // Современные проблемы науки и образования. 2014. №3. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=13658> (дата обращения: 20.05.2017)
45. Удинцев С.Н., Вахрушев В.В. Детоксицирующая композиция для биологически активных пищевых добавок // Патент 2179856. Заявл. 2000-07-13; Оpubл. 27.02.2002. URL: <http://www.findpatent.ru/patent/217/2179856.html> (дата обращения: 20.05.2017).
46. Абакумова Ю.В. Новая технология лечебно-профилактического питания работающих во вредных и особо вредных условиях труда как часть комплексной профилактики вредного воздействия производственной среды // Вестник медицинского института РЕАВИЗ. 2013. №1. С. 33–43.
47. Шрам Н.И., Бабиян Л.К., Трухина В.И., Белоногова В.Д., Гилева А.А., Веселкова Т.А. Разработка и исследование спиртовых извлечений из пчелиного подмора и личинок восковой моли // Фундаментальные исследования. 2014. №6. С. 956–958.
48. Коноплева М.М. Продукты жизнедеятельности медоносной пчелы. Сообщение 2. // Вестник фармации. 2011. №4 (54) С. 82–94.
49. Кароматов И.Дж., Давлатова М.С. Кумыс как лечебное средство // Электронный научный журнал «Биология и интегративная медицина» 2017. №1. С. 223–231. URL: <http://integmed.uz/7/7num.pdf> (дата обращения 05.08.2017)
50. Karyadi E., West C.E., Schultink W., Nelwan R.H., Gross R., Amin Z., Dolmans W.M., Schlebusch H., van der Meer J.W. A double-blind, placebo-controlled study of vitamin A and zinc supplementation in persons with tuberculosis in Indonesia: effects on clinical response and nutritional status // *Am J Clin Nutr*. 2002. Vol. 75. No. 4. P. 720–727.
51. Федько И.В., Калинкина Г.И., Коломиец Н.Э. Исследование элементного состава растений, рекомендуемых к применению при туберкулезе легких // Вестник ЗабГУ. 2013. №3 (94). С. 55–58.
52. Choi R., Kim H.T., Lim Y., Kim M.J., Kwon O.J., Jeon K., Park H.Y., Jeong B.H., Koh W.J., Lee S.Y. Serum concentrations of trace elements in patients with tuberculosis and its association with treatment outcome // *Nutrients*. 2015. No. 7(7). P. 5969–5981. DOI: 10.3390/nu7075263
53. Karyadi E., Schultink W., Nelwan R.H., Gross R., Amin Z., Dolmans W.M., van der Meer J.W., Hautvast J.G., West C.E. Poor micronutrient status of active pulmonary tuberculosis patients in Indonesia // *Eur J Clin Nutr*. 2000. No. 130(12). P. 2953–2958.
54. Федько И.В., Исмазова Р.Р., Коломиец Н.Э., Камбалина М.Г., Хвощевская А.А. Поиск растений – источников кремния для лечения туберкулеза легких // Башкирский химический журнал. 2013. Т. 20. №2. С. 148–150.
55. Федько И.В., Хвощевская А.А., Камбалина М.Г. Растения семейства Asteraceae как возможные источники кремния // Вестник ЗабГУ 2013. №4 (95). С. 66–69.
56. Машанов А.В., Юшков Г.Г. Значение микроэлемента цинка для организма человека и исследование цинк-содержащих препаратов в условиях экспериментально-биологического моделирования (обзор) // Вестник АГТА. 2009. Т. 3. № 1. С. 136–140.
57. Сальникова Е.В. Цинк – эссенциальный микроэлемент (обзор) // Вестник ОГУ 2012. №10 (146). С. 170–172.
58. Сысуев Б.Б. Технология изготовления пероральной жидкой лекарственной формы с бишофитом и методы ее анализа // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2006. № 4. С. 42–46.
59. Minchella P.A., Donkor S., Owolabi O., Sutherland J.S., McDermid J.M. Complex anemia in tuberculosis: the need to consider causes and timing when designing interventions // *Clin Infect Dis*. 2015. 60(5). С. 764–772. DOI: 10.1093/cid/ciu945
60. Фаррахов Е.Г., Вольфсон И.Ф. Медицинская геология: состояние и перспективы в России и странах СНГ // Разведка и охрана недр. 2010. №2. С. 56–63.
61. Мурзагулова К.Б., Арипжанова З.Ж., Мусабаява Б.Х. Диспергирование и синтез «зеленой химии» наночастиц металлов // Молодой ученый. 2014. №7. С. 17–20.
62. Табриз Н.С. Эффективность фитопрепарата «Экдифит» в комплексном лечении туберкулеза // Сибирский медицинский журнал. 2010. №2. С. 116–118.
63. Кароматов И.Дж., Кароматов С.И. Восковая моль перспективное лечебное средство // Биология и интегративная медицина. 2016. №3. С. 56–65.
64. Rachkov A.K., Spiridonov N.A., Kondrashova M.N. Adaptogenic and cardioprotective action of *Galleria mellonella* extract in rats and frogs // *J. Pharm. Pharmacol*. 1994. Mar. 46 (3). P. 221–225.
65. Plantevin G., DeReggi M., Nardon C. Changes in ecdysteroid and juvenile hormone titres in the hemolymph of *Galleria mellonella* larvae and pupae // *Gen. Comp. Endocrinol*. 1984. V. 56. P. 218–230. DOI: 10.1016/0016-6480(84)90034-0

References

1. Federal clinical recommendations on diagnostics and treatment of tuberculosis of respiratory organs [Internet]. Moscow, 2014. 38 p. [cited 2017 Aug 02]. Available from: http://roftb.ru/netcat_files/doks/protokol1.pdf. Russian.
2. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023 [Internet]. WHO, 2013. 80 p. [cited 2017 Aug 02]. Available from: http://online.zakon.kz/Document/?doc_id=31543474. Russian.
3. Fedko IV. Perspektiva ispolzovaniya rastenij narodnoj mediciny pri fitoterapii tuberkuleza legkih [The prospect of use of plants in traditional herbal medicine treating pulmonary tuberculosis]. Toms State Pedagogical University Bulletin. 2013;8(136): 210–2. Russian.
4. Korzunova A. Ochishchenie i vosstanovlenie organizma narodnymi sredstvami posle tuberkuleza [Purification and recovery of the body of folk remedies after tuberculosis]. Moscow: 2013. 160 p. Russian.
5. Galant. [Internet]. [cited 2017 Aug 02]. Available from: <http://tuberculum.ru/>.
6. Melmur. [Internet]. [cited 2017 Aug 02]. Available from: <http://www.melmur.ru/katalog-tovarov/pcheloproducty.html>.
7. Med-konfitur. [Internet]. [cited 2017 Aug 02]. Available from: https://www.med-konfitur.ru/catalog/melmur_1/.
8. Phytolaboratory Marislavna. [Internet]. [cited 2017 Aug 02]. Available from: <http://marislavna.ru/o-nas/>.
9. Herbs Of The Caucasus. [Internet]. [cited 2017 Aug 02]. Available from: <http://www.greenph.ru/>.
10. Phytopharmacy «Altaymix». [Internet]. [cited 2017 Aug 02]. Available from: <http://altaymix.ru/catalog/fitochai.html>.
11. Barnaulov OD, Barnaulov AO, Pospelova ML. inventors. Patent 2411954 A61K 36/00 - №2009112475/15, 03.04.2009 20.02.2011. [Internet]. Sbor dlya lecheniya tuberkuleza legkih [Herb mixture of treatment of pulmonary tuberculosis]. [cited 2017 Aug 02]. Available from: <http://www.findpatent.ru/patent/241/2411954.html>. Russian.
12. Markhayev AG, Ubeeva IP, Badleeva MV. Vozmozhnosti fitoterapii v korrektsii gepatotoksicheskikh effektov pri himioterapii tuberkuleza [Phytotherapy possibilities in correction of hepatotoxic effects at the pharmacotherapy of tuberculosis]. Acta biomedica scientifica. 2010;2 (72):67–70. Russian.
13. Mikheyeva NV, Tatarintseva MP, Ivanova OG, Taranik IN, Martynova GG, Stepochkina SP. Primenenie ekstrakta pihty v kompleksnom lechenii bolnyh tuberkulezom organov dyhaniya [Fir extract in complex treatment of the patients with respiratory tuberculosis]. Siberian Medical Review. 2011;72(6):114–16. Russian.
14. Makeev OG, Korotkov AV, Buraev ME, Gismatov RH, Kostukova SV. Primenenie kompleksa faktorov rastitel'nogo proiskhozhdeniya dlya lecheniya bolnyh tuberkulezom legkih [The use of factors of plant origin for the treatment of pulmonary tuberculosis]. Journal of Ural Medical Academic Science. 2010;(2):95–7. Russian.
15. Gelberg IS, Volf SB, Alekso EN, Avlasenko VS, Shevchuk DV, Krotkova EN, Mojseenok AG, Naumov AB. Narusheniya rezistentnosti metabolizma pri tuberkuleze i metody patogeneticheskogo vozdejstviya v ego kompleksnom lechenii [Resistant and metabolic disorders in tuberculosis and methods of pathogenic effect in its combination therapy]. Journal of the Grodno State Medical University. 2009; (1):123–8. Russian.
16. Konovalov DA. Prirodnye poliacetilenovye soedineniya [Natural polyacetylene compounds]. Pharmacy & Pharmacology. 2014;4(5):23–47. DOI:10.19163/2307-9266-2014-2-4(5)-23-47. Russian.
17. Ramachandran Sarojini Santhosh, Balasubramanian Suriyanarayanan. Plants: a source for new antimycobacterial drugs. Planta Med. 2014;80(01):9–21. DOI: 10.1055/s-0033-1350978.
18. Nasuhova AM, Orobinskaya VN, Konovalov DA, Kuzmina UA, Shchanukova ZH. Prirodnye poliacetilenovye soedineniya s protivotuberkuleznoj aktivnostyu [Natural polyacetylene compounds with antitubercular activity]. Medical News of North Caucasus. 2016;11(4): 595–9. Russian.
19. Laïd Boukraâ, Fatiha Abdellah, Leïla Ait-Abderrahim. Antimicrobial properties of bee products and medicinal plants. In: Méndez-Vilas A. editor. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. [Internet] [cited 2017 May 20]. Available from: <http://www.formatex.info/microbiology4/vol2.html>
20. Philippova GV, Pavlov HG, Shashurin MM, Kerschengoltz BM. Vliyanie ekstraktov sloevishch severnyh lishajnikov ekstragirovannyh razlichnymi sposobami na biologicheskie svoystva mikobakterij tuberkuleza [Influencing of extracts of northew lichen thallus obtained by different ways on biological properties of mycobacterium tuberculosis]. Siberian medical journal (Irkutsk). 2008;(3):99–103. Russian.
21. Konovalov DA, Khamilonov AA. Biologicheski aktivnye soedineniya polyni odnoletnej Efirnoe maslo [Biologically active compounds of artemisia annua. essential oil biologically active compounds of artemisia annua. Essential oil]. Pharmacy & Pharmacology. 2016;4(4):4–33. DOI:10.19163/2307-9266-2016-4-4-4-33. Russian.
22. Konovalov YB, Konovalov DA. Protivotuberkuleznaya aktivnost efirnogo masla polyni avstrijskoj [Anti-TB activity of essential oil of wormwood Austrian]. Science review. 2005;(3):13–5. Russian.
23. Novikova NM. Protivotuberkuleznaya aktivnost efirnyh masel vydelennyh iz polynej flory Kazakhstana [Activity of essential oils derived from wormwood of kazakhstan's flora against agent of tuberculosis]. Medicine and ecology. 2012;(2):104–5. Russian.
24. Seydahmetova RB, Bejsenbaeva AA, Atazhanova GA, Suleimenov EM, Pak RN, Kulyasov AT, Adekenov SM. Himicheskij sostav i biologicheskaya aktivnost polyni gladkoj [Chemical composition and biological activity of Artemisia glabella Kar. et Kir.]. Pharmaceutical Chemistry Journal. 2002;(3): 27–30. Russian.
25. Bondarenko RA, Polyakov VV, Lopukhin NC. Patent 26566 RK Published: 25.12.2012. Sposob polucheniya efirnogo masla po chek topolya balzamicheskogo obladayushchego protivotuberkuleznoj aktivnostyu [Method of obtaining the essential oil of the buds of poplars, possessing anti-TB activity]. [Internet]. [cited 2017 May 20]. Available from: <http://kzpatents.com/>. Russian.

26. Instructions for use of the drug for professionals "Aperol". Committee of Pharmacy of the Ministry of health of RK No.139. [Internet]. [cited 2017 Aug 8]. Available from: http://online.zakon.kz/Document/?doc_id=30484212#pos=0;134. Russian.
27. Seydahmetova RB, Pak RN, Rakhimov KD. Eferol sredstvo dlya lecheniya patologii dyhatelnyh putej [Aperol remedy for the treatment of diseases of the respiratory tract]. In: Foundation pile. Probl. farmakol: abstracts of the 2nd Congress of the Russian scientific society of pharmacologists. Moscow: 2003. 148 p. Russian.
28. Viswanathan V, Phadatare AG, Mukne A. Antimycobacterial and antibacterial activity of *Allium sativum* Bulbs. *Indian J Pharm Sci.* 2014;76(3):256–61.
29. Singh R, Hussain S, Verma R, Sharma P. Anti-mycobacterial screening of five Indian medicinal plants and partial purification of active extracts of *Cassia sophora* and *Urtica dioica*. *Asian Pac J Trop Med.* 2013;(5):366–71. DOI: 10.1016/S1995-7645(13)60040-1.
30. Nazarova GN, Sukhenko LT, Maslov AK. Vliyanie ekstraktov nekotorykh rastenij Astrahanskoj oblasti na kletki mikobakterij tuberkuleza [The extracts effect some of Astrakhan region plants on the cells of mycobacterium tuberculosis]. *Journal of new medical technologies.* 2007; XIV(4): 44. Russian.
31. Katikova OI, Asanov BM, Vize-Khripunova MA, Burba EN, Ruzov VI. Use of the plant hepatoprotector *Galstena* tuberculostatics-induced hepatic lesions: experimental and clinical study. *Probl Tuberk.* 2002;(4):32–6.
32. Kolomiets NE, Sheikin VV, Ratkin AV, Bondarchuk RA. Gepatoprotektornye svoystva hvoshcha polevogo [Hepatoprotective properties of common horsetail (*Equisetum arvense*)]. *Pharmacy.* 2005;(4):38–40. Russian.
33. Zhusupova GE, Shalakhmetova TM, Murzakmetova MK, Gadetskaya AV, Zhusupova AI. Antioksidantnaya aktivnost nekotorykh preparatov poluchennykh na osnove rastenij Kazakhstana [Antioxidant activity of some preparations, obtained on the basis of Kazakhstani plants]. *The Novosibirsk state pedagogical university bulletin [Internet].* 2013;(5):43–65. [cited 2017 May 20]. Available from: <http://www.vestnik.nspu.ru/>. Russian.
34. Marhaev AG, Ubeeva IP, Badleeva MV. Gepatoprotektornoe dejstvie rozobtna pri lechenii tuberkuleza [Rozobtn as a hepatoprotector at treatment of the tuberculosis]. *Bulletin of the Buryat State University.* 2009;(1):59. Russian.
35. Molodtsov IA, Algina AS. Aktivnost perekisnogo okisleniya lipidov kak obosnovanie naznacheniya antioksidantov v kompleksnoj terapii tuberkuleza [Activity of lipid peroxidation as a justification of the purpose of antioxidants in complex therapy of tuberculosis]. *Medical newsletter of Vyatka.* 2009;(1):59. Russian.
36. Karomatov ID. Solodka lakrichnik lakrica primenenie v medicine (obzor literatury) [Licorice – applications in medicine (review of literature)]. *Actual problems of humanitarian and natural sciences.* 2013;(11):230–5. Russian.
37. Shikova YV, Likhoded VA, Farkhutdinov RR, Simonyan EV, Baimurzina YuL, Epifanova AV, Nevis de Silva AG, Petrova VV, Elova EV. Vliyanie produktov pchelovodstva na process obrazovaniya aktivnykh form kisloroda vozmozhnost ih primeneniya v sostave lekarstvennykh sredstv [The impact of bee products on the process of formation of oxygen active forms the possibility of their use in medicinal products]. *Bashkortostan Medical Journal.* 2013;8(6):151–3. Russian.
38. Burasheva GS, Rakhimov KD, Abilov ZhA. Himiko-tekhnologicheskie osobennosti biologicheskii aktivnogo kompleksa iz verblyuzhej kolyuchki kirgizskoj Alhagi kirgisorum schrenk [Chemical-technological features biologically active complex of camel thorn Kyrgyz (*Alhagi kirgisorum schrenk*)]. *Reports of national academy of sciences of the republic of Kazakhstan.* 2012;(2):69–80. Russian.
39. Mezentsева MV, Stahanov VA, Zaharova MV, Zotova IF, Shapoval IM, Tregubova MI, Russu LI. Perspektivy immunoterapii v kompleksnom lechenii infiltrativnogo tuberkuleza legkih [Immunotherapy perspectives in combination therapy of infiltrative pulmonary tuberculosis]. *Biopreparats (Biopharmaceuticals).* 2011;2(45):20–5. Russian.
40. Maslov AK, Nasarova GN, Sukhenko LT. Vliyanie ekstrakta iz kornya solodki na funktsionalnuyu aktivnost peritonealnykh makrofagov myshej zarazhennykh vnutribryushinno mikobakteriyami tuberkuleza [The Influence of extract licorice on functional activity of peritoneal macrophages in mice infected intraperitoneal mycobacterium tuberculosis]. *Journal of new medical technologies.* 2008;XV(4):212–3. Russian.
41. Bogutskaya EY, Tikhonov AI, Yakovleva LV. Rezultaty izucheniya immunotropnogo dejstviya novykh lekarstvennykh sredstv iz produktov pchelovodstva [Results of the study of an immunotropic action of the new medicines from the beekeeping products]. *Bulletin of pharmacy.* 2015;68(2):73–9. Russian.
42. Buzuk GN., Elyashevich EG. Farmakognosticheskaya harakteristika hvoshcha polevogo *Equisetum arvense* L. Obzor literatury [The pharmacognostic characteristic of the horsetail *Equisetum arvense* L. the literature review]. *Bulletin of pharmacy.* 2010;48(2):1–9. Russian.
43. Barnaulov OD. Vvedenie v fitoterapiyu [Introduction to herbal medicine]. SPb: 1999. 158 p. Russian.
44. Zyablitseva NS, Belousova AL, Kompancev VA, Kisieva MT. Vozmozhnosti ispolzovaniya topinambura v medicinskih celyakh [The possibilities of using of jerusalem artichoke in the medical purposes]. *Modern problems of science and education. [Internet].* 2014;(3). [cited 2017 May 20]. Available from: <http://elibrary.ru/item.asp?id=22528566>. Russian.
45. Udintsev SN, Vakhrushev VV. inventors. Patent 2179856 RF. Published: 27.02.2002. Detoksiruyushchaya kompozitsiya dlya biologicheskii aktivnykh pishchevykh dobavok [Detoxifying composition for biologically active food additives]. [Internet]. [cited 2017 May 20]. Available from: <http://www.findpatent.ru/patent/217/2179856.html>. Russian.
46. Abakumova YV. Novaya tekhnologiya lechebno-profilakticheskogo pitaniya rabotayushchih vo vrednykh i osobo vrednykh usloviyakh truda kak chast kompleksnoj profilaktiki vrednogo vozdeystviya proizvodstvennoj sredy [New technology of preventive nutrition among people working in harmful and hazardous conditions especially as part of a comprehensive prevention of technological environment exposure]. *Bulletin of the Medical Institute "REAVIZ": rehabilitation, physician and health.* 2013; (1):33–43. Russian.

47. Shramm NI, Babiyan LK, Trukhina VI, Belonogova VD, Gileva AA, Veselkova TA. Razrabotka i issledovanie spirtovyh izvlechenij iz pchelinogo podmora i lichinok voskovoju moli [Working out and exploration of alcohol extraction from bees podmore, larva of bee-moth]. Fundamental research. 2014;(6):956–8. Russian.
48. Konopleva MM. Produkty zhiznedejatelnosti medonosnoj pchely [The products of the honey-bee]. Bulletin of pharmacy. 2011;4(54):82–94. Russian.
49. Karomatov ID, Davlatova MS. Kumys kak lechebnoe sredstvo [Koumiss as remedy]. The electronic scientific journal "Biology and integrative medicine" [Internet]. 2017;(1) [cited 2017 may 20]. Available from: https://elibrary.ru/download/elibrary_28963099_22055795.pdf. Russian.
50. Karyadi E, West CE, Schultink W, Nelwan RH, Amin Z, Dolmans WM, Schlebusch H, van der Meer JW. A double-blind, placebo-controlled study of vitamin A and zinc supplementation in persons with tuberculosis in Indonesia: effects on clinical response and nutritional status. Am J Clin Nutr. 2002;75(4):720–7.
51. Fedko I, Kalinkina G, Kolomiets N. Issledovanie elementnogo sostava rastenij rekomenduemyh k primeneniyu pri tuberkuleze legkih [Study of elementary composition of plants recommended for use in pulmonary tuberculosis]. Transbaikalskij gosudarstvennyj universitet. 2013;3(94):55–8. Russian.
52. Choi R, Kim HT, Lim Y, Kim MJ, Kwon OJ, Jeon K, Park HY, Jeong BH, Koh WJ, Lee SY. Serum concentrations of trace elements in patients with tuberculosis and its association with treatment outcome. Nutrients. 2015;7(7):5969–81. DOI: 10.3390/nu7075263
53. Karyadi E, Schultink W, Nelwan RH, Gross R, Amin Z, Dolmans WM, van der Meer JW, Hautvast JG, West CE. Poor micronutrient status of active pulmonary tuberculosis patients in Indonesia. Eur. J. Clin Nutr. 2000;130(5):2953–58.
54. Fedko IV, Ismatova RR, Kolomiets NE, Kambalina MG, Khvaschevskaya AA. Poisk rastenij istochnikov kremniya dlya lecheniya tuberkuleza legkih [Plant search as source of Si for treating pulmonary tuberculosis]. Bashkirskij himicheskij zhurnal. 2013;20(2):48–160. Russian.
55. Fedko I, Khvaschevskaya A, Kambalina M. Rasteniya semeystva Asteraceae kak vozmozhnye istochniki kremniya [Plants of the Asteraceae as possible sources of silicon]. Transbaikalskij gosudarstvennyj universitet. 2013;4(95):66–9. Russian.
56. Mashanov VA, Yushkov GG. Znachenie mikroelementa cinka dlya organizma cheloveka i issledovanie cinksoderzhashchih preparatov v usloviyah eksperimentalno-biologicheskogo modelirovaniya (obzor) [The value of the micronutrient zinc for the human body and study of zinc-containing preparations in conditions of experimental biological modeling (a review)]. Vestnik of AGTA. 2009;3(1):136–40. Russian.
57. Salnikova E.V. Cink esencialnyj mikroelement (obzor) [Zinc – essential trace elements (review)]. Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta. 2012;10(146):170–2. Russian.
58. Sysuev B.B. Tekhnologiya izgotovleniya peroralnoj zhidkoj lekarstvennoj formy s bishofitom i metody ee analiza [Technology of compounding of peroral liquid medication form with bishofit and the methods of its analysis]. Journal of Volgograd state medical university. 2006;(4):42–6. Russian.
59. Minchella PA, Donkor S, Owolabi O, Sutherland JS, McDermid JM. Complex anemia in tuberculosis: the need to consider causes and timing when designing interventions. Clin Infect Dis. 2015;60(5):764–72. DOI: 10.1093/cid/ciu945
60. Farrahov EG, Volfson IF. Medicinskaya geologiya sostoyanie i perspektivy v Rossii i stranah SNG [Medical geology: status and prospects in Russia and CIS]. Prospect and protection of mineral resources 2010;(2):56–63. Russian.
61. Murzagulova KB, Aripzhanova ZZ, Mussabayeva BH. Dispergirovaniye i sintez zelenoj himii nanochastich metall-ov [The dispersion and synthesis "green chemistry" nanoparticles of metals]. Molodoi uchenij. 2014;(7):17–20. Russian.
62. Tabriz NS. Effektivnost fitopreparata Ekdifit v kompleksnom lechenii tuberkuleza [The efficiency of phytopreparation «Ecdyphyt» in complex treatment of tuberculosis]. Sibirskij medicinskij zhurnal. 2010;2:116–8. Russian.
63. Karomatov ID, Karomatov SI. Voskovaya mol perspektivnoe lechebnoe sredstvo [Galleria mellonella perspective remedy]. Biologiya i integrativnaya medicina. 2016;(3): 55–56. Russian.
64. Rachkov AK, Spiridonov NA, Kondrashova MN. Adaptogenic and cardioprotective action of Galleria mellonella extract in rats and frogs. J. Pharm. Pharmacol. 1994; Mar. 46 (3):221–5.
65. Plantevin G, DeReggi M, Nardon C. Changes in ecdysteroid and juvenile hormone titres in the hemolymph of Galleria mellonella larvae and pupae. Gen. Comp. Endocrinol. 1984;56:218–30. DOI: 10.1016/0016-6480(84)90034-0

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Ким Марина Емельяновна – кандидат фармацевтических наук. Вице-президент компании «Ромат», Республика Казахстан, г. Павлодар. Область научных интересов: разработка и коммерциализация лекарственных препаратов.

Мурзагулова Кунназ Баймухановна – доктор

Kim Marina Emelyanovna – Candidate of Sciences (Pharmacy). Vice-president of the «Romat» company, Republic of Kazakhstan, Pavlodar. Research interests: development and commercialization of drugs.

Murzagulova Kunnaz Baimukhanovna – Doctor of Sciences (Chemistry), professor. Vice-president of sci-

химических наук, профессор. Вице-президент по науке компании «Ромат», г. Павлодар, Республика Казахстан. Область научных интересов: органический синтез и поиск новых биологически активных соединений, разработка технологий лекарственных препаратов, организация доклинических и клинических испытаний. E-mail: vpn@romat.kz

Евсеева Снежана Борисовна – кандидат фармацевтических наук, технолог компании «Ромат», г. Павлодар, Республика Казахстан. Область научных интересов – технология переработки природного сырья, технологические исследования лекарственных форм и косметических средств. E-mail: sbevseeva@yandex.ru.

ence and new technologies of «Romat» pharmaceutical company, Pavlodar, Republic of Kazakhstan. Research interests: organic synthesis and search for new biologically active compounds, development of technology of active substance and pharma products, nanotechnologies in pharmaceutical industry, organization and control of pre-clinical and clinical trials. E-mail: vpn@romat.kz, murzagulova@inbox.ru.

Evseeva Snezhana Borisovna – Candidate of Sciences (Pharmacy), technologist of «Romat» pharmaceutical company, Pavlodar, Republic of Kazakhstan. Research interests: technology of natural resources processing, technological development of dosage forms and cosmetics. E-mail: sbevseeva@yandex.ru.

Поступила в редакцию: 24.08.2017

Принята к печати: 25.09.2017

Received: 24.08.2017

Accepted for publication: 25.09.2017

УДК 57.083.132

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ НАЕМОПНІLUS ІNFLUENZAE ТІП В – ПРОДУЦЕНТОВ ПОЛІРІБОЗІЛРІБІТОЛФОСФАТА – ОСНОВНОГО КОМПОНЕНТА ПОЛІСАХАРІДНИХ ВАКЦИН

**Е.Л. Салимова, А.Д. Конон, С.В. Петровский,
В.П. Трухин, И.В. Красильников**

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов»

Федерального медико-биологического агентства
198320, Санкт-Петербург, г. Красное Село, ул. Свободы, д. 52
E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru

Одной из актуальных задач современной иммунобиотехнологии является разработка и внедрение эффективной вакцины против гемофильной инфекции, возбудителем которой является бактерия *Haemophilus influenzae* тип b (Hib). Основным действующим веществом вакцины против Hib-инфекции является капсульный полисахарид полирибозилрибитолфосфат (ПРФ), который выделяют из культуральной жидкости *H. influenzae* тип b. Важным технологическим этапом получения ПРФ является культивирование штамма-продуцента в условиях, позволяющих получить максимальное количество целевого продукта. На данный момент планируется подбор оптимальных условий культивирования штамма *H. influenzae* тип b B-7884, изолированного и идентифицированного ранее сотрудниками ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России. **Цель** данной работы – обобщить и проанализировать данные литературы относительно особенностей культивирования штаммов *H. influenzae* тип b, а также выделения основных факторов, влияющих на биосинтез ПРФ. **Материалы и методы.** В процессе подбора материала для написания обзорной статьи использовали базы данных Google Patents, Science Research Portal, Google Scholar, ScienceDirect, CiteSeer, Publications, ResearchIndex, Ingenta, PubMed, KEGG и др. **Результаты и обсуждение.** В результате анализа литературы были выделены основные факторы, влияющие на биосинтез ПРФ: природа и концентрация источников углерода и азота в составе питательной среды, концентрация факторов роста (никотинамидадениндинуклеотид, гемин, витамины), дополнительное внесение подпитки, регуляция pH в процессе культивирования, скорость перемешивания. Обобщены данные по штаммам-продуцентам ПРФ и условиям их культивирования, а также количеству синтезированного ПРФ, которое существенно зависит и от физиологических возможностей биологического агента, и от факторов, влияющих на регуляцию метаболизма. **Заключение.** Результаты данной работы будут учитываться при проведении исследований по оптимизации условий культивирования штамма *H. influenzae* тип b B-7884.

Ключевые слова: *Haemophilus influenzae* тип b, гемофильная инфекция, культивирование, питательные среды, полирибозилрибитолфосфат

Для цитирования:

Салимова Е.Л., Конон А.Д., Петровский С.В.,
Трухин В.П., Красильников И.В.
ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ
НАЕМОПНІLUS ІNFLUENZAE ТІП В – ПРОДУЦЕН-
ТОВ ПОЛІРІБОЗІЛРІБІТОЛФОСФАТА – ОСНОВНО-
ГО КОМПОНЕНТА ПОЛІСАХАРІДНИХ ВАКЦИН.
Фармация и фармакология. 2017;5(5):422-441.
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-422-441

© Салимова Е.Л., Конон А.Д., Петровский С.В.,
Трухин В.П., Красильников И.В., 2017

For citation:

Salimova E.L., Konon A.D., Petrovskii S.V.,
Truhin V.P., Krasilnikov I.V.
PECULIARITIES OF CULTIVATION OF НАЕМОПНІ-
LUS ІNFLUENZAE TYPE b STRAINS – PRODUCERS
OF POLYRIBOSYL RIBITOL PHOSPHATE – THE MAIN
COMPONENT OF POLYSACCHARIDE VACCINES.
Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(5):422-441. (In Russ.)
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-422-441

PECULIARITIES OF CULTIVATION OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* TYPE B STRAINS – PRODUCERS OF POLYRIBOSYL-RIBITOL PHOSPHATE – THE MAIN COMPONENT OF POLYSACCHARIDE VACCINES

E.L. Salimova, A.D. Konon, S.V. Petrovskii, V.P. Truhin, I.V. Krasilnikov

The federal state unitary enterprise “Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency
52, Svoboda Str, Krasnoe selo, St.-Peterburg, Russia, 198320
E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru

One of the up-to-date challenges of modern immunobiotechnology is the development and introduction of an effective vaccine against the infection caused by the bacterium *Haemophilus influenzae*, type b (Hib). The main active substance of the vaccine against Hib infection is the capsular polysaccharide polyribosylribitol phosphate (PRP), which is isolated from the fermentation broth of *H. influenzae* type b. An important technological step in obtaining PRP is the cultivation of the producer strain under conditions that allow obtaining the maximum amount of the target product. At the moment, it is planned to select the optimal conditions for cultivation of *H. influenzae* type b B-7884, which had been earlier isolated and identified by the employees of FSUE “Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of FMBA, Russia. The analysis of literature data concerning the cultivation of *H. influenzae* type b was made in order to identify the main factors influencing the biosynthesis of PRP. The **aim** of the investigation is to analyze and summarize the literature data on the cultivation peculiarities of *haemophilus influenzae* of b-type strains. **Materials and methods.** In the process of selecting the material for writing this review article. The databases of Google Patents, Science Research Portal, Google Scholar, ScienceDirect, CiteSeer Publications ResearchIndex, Ingenta, PubMed, KEGG, etc. were used. **Results and discussion.** As a result of the literature analysis, the main factors influencing the PRP biosynthesis were identified: the nature and concentration of carbon and nitrogen sources in the growth medium, the concentration of growth factors (nicotinamide adenine dinucleotide, hemin, vitamins), additional feed, pH adjustment during cultivation, stirring speed. The data of PRP-producing strains and the conditions of their cultivation have been summarized, as well as the amount of synthesized PRP, which essentially depends on both the physiological capabilities of the biological agent and the factors effecting the regulation of metabolism. **Conclusion.** The results of this work will be taken into account in carrying out the researches for optimization of *H. influenzae* type b B-7884 strain cultivation conditions.

Keywords: *Haemophilus influenzae* type b, hemophilic infection, cultivation, growth mediums, polyribosylribitol phosphate

Введение. Одной из основных причин заболеваемости и смертности детей младшего возраста от пневмонии и менингита является бактерия *Haemophilus influenzae* тип b (Hib) [1–5]. Считается, что единственный эффективный способ предотвращения инфекций, вызываемых Hib (гемофильной инфекции), – вакцинация [6–11].

В состав вакцины против гемофильной инфекции входит капсульный полисахарид полирибозилрибитолфосфат (ПРФ), синтезируемый *H. influenzae* тип b в значительных количествах при росте на жидких питательных средах [12]. Известно, что одним из наиболее важных этапов при производстве вакцин является культивирование продуцента в оптимальных условиях, что позволяет получить максимальный выход целевого продукта с минимальными затратами.

Ранее сотрудниками ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России был изолирован штамм идентифицированный как *H. influenzae* тип b. Проведено депонирование данного штамма в Государственной коллекции патогенных микроорга-

низмов и клеточных культур «ГКПМ – Оболенск» Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) под номером B-7884 для целей национальной патентной процедуры [13], в результате которой был получен патент на изобретение [14]. Подобраны условия получения и отработаны методики контроля Главной и Рабочей посевной культуры. На следующем этапе планируется подбор оптимального компонентного состава жидкой питательной среды, а также условий культивирования штамма B-7884 для получения максимального количества капсульного полисахарида полирибозилрибитолфосфата (ПРФ).

Цель данной работы – обобщить и проанализировать данные литературы относительно особенностей культивирования штаммов *H. influenzae* тип b.

Материалы и методы. В процессе подбора материала для написания обзорной статьи использовали базы данных Google Patents, Science Research Portal, Google Scholar, ScienceDirect, CiteSeer, Publications, ResearchIndex, Ingenta, PubMed, KEGG и др. Поиск статей проводили по ключевым словам «*Haemophilus*

influenzae type b», «PRP», «cultivation», «culture medium», «fermenter».

Результаты и обсуждение. Подбор оптимальных условий культивирования, в первую очередь, связан с физиологическими особенностями продуцента и закономерностями синтеза целевого продукта. Учитывая, что полирибозилрибитолфосфат является капсульным полисахаридом *H. influenzae* тип b, вопросы, связанные с его биосинтезом в зависимости от фазы роста продуцента, выделением в питательную среду, влиянием предшественников биосинтеза, зависимостью образования полисахарида от скорости накопления биомассы особо интересны [15].

Так, еще в 70-х годах прошлого века было установлено, что синтез ПРФ у шести исследуемых штаммов *H. influenzae* тип b происходит одновременно с ростом культуры и максимальный уровень накопления целевого продукта наблюдается в ранней стационарной фазе роста [16].

Капсульный полисахарид синтезируется экзогенно, его освобождение в культуральную жидкость происходит через несколько часов после окончания биосинтеза. При этом скорость освобождения полисахарида в экспоненциальной фазе роста индивидуальна для каждого штамма. Выделение ПРФ в питательную среду происходило самопроизвольно, однако авторы [16] подчеркивают, что для ускорения данного процесса и увеличения количества синтезированного полисахарида целесообразным является нагревание или обработка биомассы ультразвуком.

Другой интересный подход по увеличению количества отделяемого полисахарида описан в патенте [17]. Авторы предложили по завершению ферментации снижать температуру до комнатной и выдерживать в таких условиях культуральную жидкость. Показано, что количество синтезированного ПРФ через 12 ч культивирования составляло 330 мкг/мл, а выдерживание при комнатной температуре несколько часов после 16 ч культивирования позволяло увеличить уровень антигена до 480 мкг/мл. Исследователи обращают внимание на необходимость начала охлаждения в определенное время: раньше – возможны потери по полисахариду, позже – может происходить лизис клеток и дополнительная контаминация [17].

Исследователи также отмечают, что интенсификация биосинтеза целевого продукта возможна как непосредственно за счет увеличения уровня биомассы (например, при внесении источников углеводов или увеличения аэрации), так и при увеличении биосинтетической способности штамма. Например, буферизация питательной среды приводила к удлинению стационарного роста продуцента с последующим увеличением количества синтезированного ПРФ [16].

Ученые также изучали влияние предшественников биосинтеза на образование капсульного полисахарида при росте *H. influenzae* тип b на среде, содержащей гидролизат казеина и дрожжевой экстракт. Показано, что максимальный уровень ПРФ (63–65 мкг

пентозы ПРФ/мл) наблюдали при добавлении 0,1% рибозы или 0,5% глюкозы, тогда как без предшественников он был в 6,3–6,5 раза ниже. Интересно, что добавление рибитола не влияло на биосинтез целевого продукта. Авторы объясняют данное явление проблемами транспорта и активации данного C_5 -спирта в клетке [16].

В 60-70-х годах XX столетия учеными стали активно предлагаться синтетические среды для культивирования штаммов *H. influenzae*. Первые синтетические и полусинтетические питательные среды, используемые для выделения и поддержания роста *H. influenzae*, имели очень сложный, многокомпонентный состав, включая множество аминокислот, витаминов, факторы роста, неорганические соли. Например, среда Herriott [18] содержала 30 компонентов. В другой работе [19] предложена синтетическая питательная среда, состоящая из 29 компонентов.

В тоже время проводились эксперименты по упрощению ее состава. Так, Klein R.D. с соавт. было предложено две модификации среды Herriott и количество компонентов уже снижено до 13–14 позиций [20].

Учитывая метаболические особенности *H. influenzae* тип b, еще в 80-х годах прошлого столетия исследователи стали уделять значительное внимание влиянию гемина (фактор X) и никотинамидадениндинуклеотида (НАД, фактор V) на рост культуры, а в дальнейшем и на биосинтез ПРФ [21].

Относительно исследований, проводимых на сегодняшний день, среди них можно выделить несколько направлений: поиск наиболее продуктивных штаммов, подбор оптимальных условий культивирования, а также изучение биосинтеза ПРФ на альтернативных средах без компонентов животного происхождения.

В статье [22] описано изучение биосинтеза ПРФ пятью штаммами *H. influenzae* тип b, изолированными от больных детей и условно названными H. inf. 1, H. inf. 2, H. inf. 3, ATF1 (ATCC 35540) и ATF2 (ATCC 10210). Показано, что максимальный синтез ПРФ (192 мкг/мл) и концентрация клеток ($3,3 \cdot 10^{11}$ КОЕ/мл) среди изученных штаммов были характерны для штамма ATF2 при росте на GC бульоне с факторами роста.

Похожие исследования были проведены для других семи штаммов [23]. Изучали штаммы, выделенные от больных детей (Hib(1), Hib(2), Hib(3), Hib(4b), Hib(7b)), а также штаммы из американской коллекции ATCC 35540 (Hib(5s)) и ATCC 10210 (Hib(6s)). Интересно, что в данном случае максимальная концентрация клеток наблюдалась для четырех штаммов на среде сердечно-мозгового бульона (ВН) с добавками факторов роста и составляла 10^{13} КОЕ/мл. При этом наибольшая концентрация синтезированного полисахарида была характерна для штамма ATCC 35540 (Hib(5s)) и составляла 321 мкг/мл [23].

Различные способы культивирования также могут влиять на выход капсульного полисахарида. Так, бразильские ученые [24] исследовали особенности роста и синтеза ПРФ штаммом GB 3291 при пери-

одической ферментации в течение 24 ч (вариант 1), при ферментации с подпиткой глюкозой (5 г/л) на 9 ч (вариант 2) и при ферментации с заменой питательной среды через 12 ч культивирования (вариант 3). Показано, что при использовании варианта 1 концентрация ПРФ составляла 140 мкг/мл, а накопление целевого продукта было сопряжено с ростом культуры. Культивирование с подпиткой не позволило увеличить концентрацию целевого продукта в связи с тем, что дополнительно внесенная глюкоза практически не потреблялась культурой. Использование третьего способа культивирования позволило увеличить продуктивность до 87 мг ПРФ/г биомассы при второй ферментации после замены питательной среды, тогда как при первом варианте культивирования она составляла 67 мг ПРФ/г биомассы. Отметим, что сама концентрация полисахарида практически не отличалась в зависимости от выбранного способа ферментации (относительная вариация 0–17%) и была на уровне 132–155 мкг/мл. Используя подходы к математическому описанию процесса ферментации, предложенные Коно-Асай и Луедекен-Пирет, авторы подтвердили свое предположение, что накопление целевого продукта напрямую связано с накоплением биомассы [24].

Интересными являются дальнейшие исследования данных ученых, которые установили следующие закономерности синтеза ПРФ штаммом *H. influenzae* тип b GB 3291 и смогли в значительной степени увеличить его продуктивность [25]. На биосинтез полисахарида оказывает значительное влияние регуляция pH: поддержание pH на нейтральном уровне ($7,2 \pm 0,2$) позволяет увеличить выход ПРФ. Так, с регуляцией pH и выходом на стационарную фазу роста синтез антигена продолжался и увеличивался, в отличие от варианта без регуляции pH, где увеличение количества антигена наблюдали только в экспоненциальной фазе роста. Подпитку в виде глюкозы (при регуляции pH) клетки быстро катаболизировали с одновременным синтезом биомассы и антигена. При выходе культуры на стационарную фазу роста потребление глюкозы замедлялось, но синтез полисахарида активно продолжался. При этом после достижения стационарной фазы роста (10 ч) подпитка напрямую конвертировалась в полисахарид (при условии регуляции pH). Кроме того, было показано, что при насыщении кислородом 30% с контролем pH количество синтезированного полисахарида составляло 943,3 мкг/мл, что было на 124 % выше по сравнению с традиционным синтезом при неизменной аэрации (420,8 мкг/мл). Поддержание парциального давления и pH на определенном уровне приводило к удлинению экспоненциальной и стационарной фаз роста и соответственно к увеличению образования ПРФ. Авторы предполагают, что регуляция pH и поддержание аэрации на определенном уровне также положительно влияет на экспрессию генов, отвечающих за синтез капсульного полисахарида [25].

Современные мировые тенденции требуют от

биотехнологов разработки новых подходов к подбору питательной среды для культивирования продуцентов, особенно тех, которые для своей жизнедеятельности требуют компоненты животного происхождения. К таким микроорганизмам относятся *H. influenzae* тип b, для культивирования которого часто используют среды с животными компонентами, например, сердечно-мозговой бульон, шоколадный агар с кровью, пептоны животного происхождения. Кроме того, фактором роста *H. influenzae* тип b является гем [26, 27], который в виде, например, раствора гема хлорида, обязательно вносят в питательную среду. Поэтому все чаще ученые уделяют внимание подбору альтернативных питательных сред на основе растительных компонентов, например, пептонов. Так, большинство современных патентов, касающихся биосинтеза ПРФ *H. influenzae* тип b, посвящены подбору оптимального состава именно таких питательных сред.

В патенте [28] приводится информация по компонентному составу питательной среды, содержащей неорганические соли, глюкозу, дрожжевой экстракт, некоторые аминокислоты, гемин и НАД, а также пептон растительного происхождения. Установлено, что при выращивании штамма *H. influenzae* тип b CS 68 на данной питательной среде количество полисахарида, собранного с 700 л культуральной жидкости, составляло 70–80 г.

В работе [29] описана модифицированная соево-пептоновая среда с дрожжевым экстрактом и оптимизированной концентрацией гема (30 мг/л) и НАД (15 мг/л), использование которой в условиях принудительной аэрации и контроля pH приводило к увеличению синтеза ПРФ до 980 мкг/мл.

Помимо подбора оптимального состава питательной среды ученые особое внимание уделяют селекции и получению высокоактивных продуцентов ПРФ. Так, в патенте [30] авторы описали гетерогенную популяцию *H. influenzae* серотипа b, которая содержит инкапсулированные и неинкапсулированные бактерии. Показано, что после 18–24 ч культивирования на селективных твердых питательных средах различали белые и серые колонии, которые значительно отличались по продуктивности. Так, белые колонии синтезировали в 3–5 раз больше ПРФ по сравнению с колониями серого цвета и их продуктивность сохранялась на протяжении 4-х генераций. Для селективного выделения высокопродуктивных белых колоний была предложена синтетическая твердая питательная среда, содержащая растительный пептон, дрожжевой экстракт, неорганические соли, углеводы, факторы роста. Ученые предположили, что клетки, образующие белые колонии, содержат как минимум два локуса, отвечающих за синтез целевого антигена [30].

Штамм с подобными генетическими характеристиками использовали авторы другого патента [31]. Они исследовали инкапсулированный штамм *H. influenzae* тип b, содержащий как минимум две копии локуса (размер между 17 и 18 кДа) в генетическом

коде, которые группируют вместе гены, отвечающие за синтез и экспрессию полисахаридной капсулы. Использование предложенной в патенте химической среды позволило получить стабильный штамм в 20 генерациях. Ученые провели значительную работу по изучению влияния компонентного состава питательной среды на биосинтез ПРФ, а также по подбору компонентов неживотного происхождения для ее состава [31]. При подборе питательной среды исследователи исключали из ее состава белки, что, по их мнению, значительно облегчает очистку целевого продукта и исключает использование пеногасителя. Установлено, что для культивирования исследуемого штамма в питательной среде должен присутствовать ряд аминокислот, при этом показана возможность регуляции биосинтеза полисахарида концентрацией аспарагиновой кислоты, аспарагина и глутамина [31]. Концентрация данных аминокислот была выбрана таким образом, чтобы направить метаболизм клетки на производство капсульного полисахарида. Кроме того, в патенте [31] описано положительное влияние на продукцию целевого продукта ряда витаминов в составе питательной среды.

При замене животных компонентов питательной среды на альтернативные встает вопрос источника гема для *H. influenzae* тип b, для которого данный порфирин является незаменимым фактором роста. В патенте [31] предложено заменить гемин животного происхождения на динатриевую соль протопорфирина или синтетический протопорфирин IX в концентрациях 0,25 и 2,0 мг/л.

Интересный подход к увеличению синтеза биомассы или целевого продукта можно использовать, применяя смеси субстратов для культивирования [32, 33]. Показано, что штамм, описанный в патенте [31], способен расщеплять глюкозу, фруктозу, галактозу, глицерин, ксилозу, рибозу, фукозу, сиаловую кислоту и лактат, а также для его культивирования можно использовать два и более источника углерода, как например, глюкозу (12–16 г/л) и лактат (0,5–10 г/л). По нашему мнению, изучение данного вопроса и работа в данном направлении может быть перспективной.

Кроме того, важным показателем, влияющим на биосинтез целевого продукта, является соотношение углерод/азот в питательной среде [34, 35]. Так, в патенте [31] подчеркивается, что соотношение пептона и дрожжевого экстракта должно быть более или равно 1, а содержание общего азота – более 0,8 г/л.

В работе авторы [36] изучали влияние концентрации декстрозы и дрожжевого экстракта на синтез ПРФ *H. influenzae* тип b ATCC No. 10211. Проводили модификацию двух питательных сред: среды, содержащей в качестве основных компонентов соевый пептон и дрожжевой экстракт (МР), а также среды, в состав которой входил казитон и дрожжевой экстракт (СУ) [37]. Модификация заключалась в изменении концентрации декстрозы и дрожжевого экстракта в пределах 0–10 и 0–7,5 г/л соответственно. Эксперименты по подбору оптимальной концентрации

источника углерода и азота проводили в колбах Эрленмейера, содержащих по 1,0 л питательной среды соответствующего варианта, на шейкер-инкубаторе при 200 об/мин, температуре 37°C на протяжении 15 ч. Установлено, что максимальный синтез ПРФ (453–511 мг/л) наблюдали при концентрации декстрозы и дрожжевого экстракта 2,5 и 6 г/л соответственно при культивировании на среде МР. При культивировании штамма в модифицированной среде МР с подобранной оптимальной концентрацией дрожжевого экстракта и глюкозы в ферментере объемом 50 л выход полисахарида составил 524 мг/л.

Таким образом, при подборе оптимального состава питательной среды для культивирования продуцента обязательно необходимо учитывать соотношение С/Н.

Опубликовано несколько работ, посвященных оптимизации условий культивирования *H. influenzae* тип b при помощи математических методов планирования [38]. Так, индийские ученые подбирали оптимальный состав питательной среды для получения ПРФ с применением плана Плакетт-Бурмана [39]. Установлено, что максимальный синтез капсульного полисахарида (183 мкг/мл) исследуемым штаммом наблюдали на подобранной среде следующего состава (г/л): глутаматная кислота – 2, дрожжевой экстракт – 15, цистеин – 0,008, декстроза – 7,5, НАД – 0,008, гемин – 0,02, NaCl – 4, NH_4Cl – 0,85, Na_2HPO_4 – 4,5, KCl – 0,11, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,6.

Другие авторы использовали центральный композиционный план и методологию поверхности отклика для подбора оптимальных значений внешних факторов (температура, pH, скорость перемешивания), влияющих на количество образующейся биомассы *H. influenzae* тип b ATCC 10211 [40]. Установлено, что при температуре 35°C, перемешивании 250 об/мин и pH 8,5 уровень сухой биомассы составлял 5471 мг/л.

Результаты по усовершенствованию технологии получения ПРФ, а также ее масштабированию представлены в работах [41, 42]. Авторы в пилотных масштабах (2 л питательной среды) модифицировали среду на основе казеиновых кислот и дрожжевого экстракта, изменяя концентрацию глюкозы, дрожжевого экстракта, гема и НАД в ее составе. Культивирование на среде с оптимально подобранным составом компонентов позволило увеличить выход ПРФ до 1050 мкг/мл, тогда как при масштабировании до 50 л и поддержании pH на уровне 7,5 и парциального давления кислорода – 30 % полученная концентрация полисахарида составила 1160 мкг/мл.

Российскими учеными предложено несколько вариантов питательных сред для культивирования *H. influenzae* тип b. Так, в патенте, принадлежащем Ростовскому научно-исследовательскому институту микробиологии и паразитологии [43], описана достаточно простая питательная среда на основе казеиновых кислот. Другие авторы за основу брали среду Klein с добавлением НАД и гема (синтетическая

среда) и дополнительным внесением казеинового пептона и глюкозы (полусинтетическая среда) [44]. Установлено, что продуктивность штамма 326 на синтетической среде составляла 90–150 мкг/мл, тогда как на полусинтетической – 80–130 мкг/мл. Синтетическую и полусинтетическую питательную среду (на основе аминокислот) для культивирования штамма 267 (Mech №1) использовали и авторы патента [45], принадлежащего Научно-исследовательскому институту вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. В другом патенте [46] описан состав питательной среды для культивирования *H. influenzae* тип b, преимуществом которой является ее низкая стоимость. В состав питательной среды входит 11 компонентов (в г/л: NaCl – 5,8; MgCl₂ – 0,2; CaCl₂ – 0,022; K₂HPO₄ – 2,720; K₂HPO₄ – 3,480; глюкоза – 5,000; гемин – 0,01; НАД – 0,004; пантотенат кальция – 0,004; тиамин – 0,004 мл; аминокислота – 300 мл), а ее приготовление включает 8 этапов. Подробно особенности культивирования *H. influenzae* тип b на полусинтетических и синтетических средах описаны в статьях данного авторского коллектива [47, 48], а закономерности синтеза полисахарида и биомассы на этих средах в зависимости от концентрации факторов роста – в работе [49]. Установлено, что увеличение концентрации гемина и НАД приводило к увеличению количества биомассы, однако количество синтезированного ПРФ снижалось.

В таблице 1 обобщены данные по условиям культивирования различных штаммов *H. influenzae* тип b

и представлены количественные показатели по биосинтезу ПРФ.

Как видно из данных, приведенных в таблице 1, для биосинтеза ПРФ штаммами *H. influenzae* тип b используются различные по составу, в основном полусинтетические питательные среды. В результате оптимизации их состава и масштабирования технологического этапа культивирования на ферментационное оборудование показатели синтеза ПРФ для некоторых штаммов были увеличены до 1000 мкг/мл. Отметим, что в отечественных доступных нам источниках литературы максимальные показатели синтеза ПРФ составляют 130–150 мкг/мл.

Закключение. Анализ литературных данных показал, что подбор оптимального состава питательной среды (концентрация углерода, азота (их соотношение), факторов роста) и самих условий культивирования (необходимость внесения подпитки, pH) позволяет достичь максимального биосинтеза капсульного полисахарида полирибозилрибитолфосфата *H. influenzae* тип b и сократить время культивирования как технологического этапа производства ПРФ. Кроме того, обязательно необходимо учитывать экономическую составляющую технологического процесса. Результаты данной работы будут учитываться при проведении экспериментальных работ по подбору питательной среды и условий культивирования штамма *H. influenzae* тип b B-7884 как при разработке технологии в лабораторных условиях, так и при ее масштабировании при опытно-промышленном производстве.

Таблица 1 – Синтез ПРФ в зависимости от условий культивирования штаммов *H. influenzae* тип b

Штамм	Питательная среда	Способ культивирования	Продуктивность, мкг/мл	Ссылка
Mad	Сердечно-мозговой бульон и триптиказо-соевая основная среда	Не указано	72,6	[16]
GB 3291	Соевый пептон – 10,0 г, диализат дрожжевого экстракта – 5,0 г, K ₂ HPO ₄ – 2,5 г, Na ₂ HPO ₄ – 13,1 г, NaH ₂ PO ₄ – 3,3 г, глюкоза – 5,0 г, гемин хлорид – 10,0 мг, НАД – 10,0 мг, дистиллированная вода – до 1 л. Поддержание pH на уровне 7,5 при помощи 5,0 н NaOH	В ферментере объемом 13 л, рабочий объем питательной среды – 7,4 л, скорость перемешивания – 100–600 об/мин, 37°C, скорость подачи воздуха – 2 л/мин. Регуляция pH не проводилась	155,0	[24]
GB 3291	Соевый пептон – 10,0 г, диализат дрожжевого экстракта – 5,0 г, K ₂ HPO ₄ – 2,5 г, Na ₂ HPO ₄ – 13,1 г, NaH ₂ PO ₄ – 3,3 г, глюкоза – 5,0 г, гемин хлорид – 30,0 мг, НАД – 15,0 мг, дистиллированная вода – до 1 л. Поддержание pH на уровне 7,2 при помощи 5,0 М NaOH	В ферментере объемом 13 л, рабочий объем питательной среды – 7,4 л, скорость перемешивания – 100–600 об/мин, 37°C, скорость подачи воздуха – 0,25 объема воздуха/объем питательной среды в мин, насыщенность воздухом на уровне 30%, поддержание pH на уровне 7,2	943,3	[25]
ATCC 35540 (Hib(5s))	Сердечно-мозговой бульон с добавками 1% раствора гемоглобина и 1% раствора Isovitalex (содержит НАД, витамины и микроэлементы)	В колбах на качалке в течение 24 ч при 37°C в присутствии 5–10% CO ₂	321,0	[23]

Продолжение таблицы 1

Штамм	Питательная среда	Способ культивирования	Продук- тивность, мкг/мл	Ссыл- ка
ATF2 (ATCC 10210)	Панкреатический гидролизат казеина – 7,5 г, пептический перевар животной ткани – 7,5 г, кукурузный крахмал – 1,0 г, K_2HPO_4 – 4,0 г, KH_2PO_4 – 1,0 г, NaCl – 5,0 г, глюкоза – 5,0 г, вода – до 1 л, дополнительно добавлены гемин – 10 мг/мл и IsovitalеХ, содержащий 0,01/мл НАД	В колбах на качалке в течение 24 ч при 37°C в присутствии 5–10 % CO_2 , pH 7,5	192,0	[22]
Mad	Казаминовые кислоты – 1 %, диализат дрожжевого экстракта – 0,5 %, NaCl и натрий-фосфатный буфер согласно прописи. Добавки в виде подготовленной лошадиной крови в количестве 1/1000 и III НАД в количестве 1 мкг/мл	Не указано	133,0 (по пентозе ПРФ)	[16]
Не указано	Глутаминовая кислота – 2,0 г, дрожжевой экстракт – 15,0 г, цистеин – 0,008 г, декстроза – 7,5 г, НАД – 0,008 г, гемин – 0,02 г, NaCl – 4,0 г, NH_4Cl – 0,85 г, Na_2HPO_4 – 4,5 г, KCl – 0,11 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,6 г, вода – до 1 л	Ферментер объемом 6 л	180,0– 183,0	[39]
A760705	L-глутаминовая кислота – 1,3 г, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ – 2,5 г, KCl – 0,09 г, NaCl – 6,0 г, NH_4Cl – 1,25 г, дрожжевой экстракт – 10 г, цистеин – 0,015 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,6 г, декстроза – 5,0 г, гемин – 0,005 г, НАД – 0,002 г, вода – до 1 л	Ферментер рабочим объемом 40 л, скорость аэрации – 5 л/мин, насыщенность воздухом на уровне 30%, скорость перемешивания – 300–700 об/мин, pH 7,0	480,0	[17]
Гетерогенная популяция (отбирали продуктивные белые колонии)	3-НАД – 5,0 мг, протопорфирин IX – 1,0 мг, глюкоза – 20,0 г, дрожжевой экстракт – 5,0 г, гороховый пептон – 7,42 г, лактат натрия в 60% водном растворе – 1,49 мл, цистин – 0,07 г, триптофан – 0,02 г, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ – 31,14 г, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ – 2,03 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,4 г, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,02 г, $(NH_4)_2SO_4$ – 1 г, вода – до 1 л	Ферментер объемом 1 л, при (37±1) °C, перемешивание, давление 0,1 бар, pO_2 – 30%, скорость подачи воздуха – 0,25 объема воздуха/объем питательной среды в мин	719,0– 904,0	[30]
ATCC10211	Казаминовые кислоты – 10,0 г/л, диализат дрожжевого экстракта – 2,5 г/л, глюкоза – 6,0 г/л, 0,1 М натрий фосфатный буфер, pH 7,6. Дополнительно на 1 л питательной среды вносили 0,015 г НАД и 0,03 г гемаина	В колбах (объем культуральной жидкости – 2 л), при 36,5 °C, 250 об/мин, с подпиткой раствором глюкозы и дрожжевого экстракта	1050,0	[42]
		В ферментере объемом 50 л, при температуре 36,5°C; скорость подачи воздуха – 0,6–0,8 объема воздуха/объем питательной среды в мин, перемешивание – 400–900 об/мин, pH – 7,3, насыщенность воздухом на уровне 30 %, с подпиткой раствором глюкозы и дрожжевого экстракта	1160,0	
	Среда, содержащая Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 , НАД, гемин, соевый пептон, дрожжевой экстракт – 2,5 г/л, декстроза – 6 г/л	В колбах (объем культуральной жидкости – 1 л), при 37°C, 200 об/мин	453,0– 511,0	[36]
		В ферментере объемом 50 л	524,0	

Штамм	Питательная среда	Способ культивирования	Продуктивность, мкг/мл	Ссылка
Капсулированный штамм, содержащий как минимум 2 копии локуса в генетическом коде	60 % лактат натрия – 1,5 мл/л, K_2HPO_4 – 300 мг/л, KH_2PO_4 – 300 мг/л, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 368 мг/л, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ – 28620 мг/л, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ – 1870 мг/л, L-аргинин – 87 мг/л, L-аланин – 134 мг/л, L-аспарагин – 198 мг/л, L-лизин – 140 мг/л, L-глутамин – 220 мг/л, L-гистидин – 78 мг/л, L-триптофан – 200 мг/л, L-валин – 115 мг/л, L-изолейцин – 130 мг/л, L-лейцин – 130 мг/л, L-тирозин – 180 мг/л, L-фенилаланин – 165 мг/л, L-цистин – 61 мг/л, L-аспарагиновая кислота – 1065 мг/л, L-глутаминовая кислота – 1471 мг/л, пиридоксин HCl – 4 мг/л, рибофлавин – 0,2 мг/л, тиамин HCl – 4 мг/л, биотин – 4 мг/л, кальций пантотенат – 4,5 мг/л, урацил – 70 мг/л, гипоксантин – 20 мг/л, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2,5 мг/л, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 20 мг/л, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 1, $MnSO_4 \cdot H_2O$ – 5 мг/л, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 13 мг/л, конечное pH – 7,2±0,1 (доведение 10 н раствором КОН) Дополнительно вносили: глюкоза – 512,8 г/л, раствор НАД, протопорфирин – 0,25 г/л, аммоний гидроксид – 5 мл/л	В ферментере 1000 л, при температуре (32±1)°С, pH (6,7±0,2) (доведение 2,5 н раствором натрия гидроксида), pO_2 поддерживали на уровне 70% путем каскадного изменения скорости перемешивания (от 100 до 230 об/мин), увеличением аэрации (от 70 до 150 л/мин), скорости потока O_2 от 0 до 500 л/мин. По мере необходимости вносили пеногаситель (4% раствор Biosputex)	865,0	[31]
CS 68	L-глутаминовая кислота – 1,5 г/л, сульфат аммония – 1,25 г/л, натрий фосфат двузамещенный двуводный ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) – 11,0 г/л, натрий фосфат однозамещенный двуводный ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) – 3,3 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, калий хлорид (KCl) – 100,0 мг/л, натрий хлорид (NaCl) – 6 г/л, экстракт растительного пептона – 10 г/л, НАД – 3,0 мг/л, гемин синтетический – 5,0 мг/л, глюкоза – 5,0 г/л, L-цистеин – 100 мг/л	При температуре 37°С, pH поддерживали на уровне 7,0	100,0–115,0	[28]
Eagan	Дрожжевой экстракт – 5 г/л, казеиновые кислоты – 22,5 г/л, двухосновный фосфат натрия – 14,4 г/л, декстроза – 5,59 г/л, гемин – 20 г, аммония гидроксид (30%) – 0,1534 мл, 1 % НАД – 0,6 мл	В ферментере 40 л, 16–18 ч	Данные не приведены	[50]
B 423	Бульон казеиновых кислот – 10,0 г/л, глюкоза – 5,0 г/л, диализат дрожжевого экстракта – 2,0 г/л, гемин – 0,001 г/л, НАД – 0,008 г/л, витамин B_{12} – 0,0005 г/л, pH 7,2–7,4	В атмосфере, насыщенной CO_2 , в течение 8–10 ч	Данные не приведены	[43]
326	Среда Klein с факторами роста (гемин, НАД) Среда Klein с факторами роста (гемин, НАД), казеиновый пептон – 20 г/л, глюкоза – 2 г/л	Ферментер марки «Анкум» в условиях принудительной аэрации при 37°С при постоянном перемешивании	90,0–150,0 80,0–130,0	[44]
267 (Mech №1)	Полусинтетическая (на основе аминокислоты) и синтетическая питательная среда	При 37°С на шуттеле при 200 об/мин. После достижения культурой стационарной фазы роста инкубацию продолжали в течение 6 часов	50,0–100,0	[45]

Introduction. One of the main causes of morbidity and mortality of young children from pneumonia and meningitis is bacteria *Haemophilus influenzae* type b (Hib) [1–5]. It is believed that the only one effective way to prevent the infections caused by Hib is vaccination [6–11].

The composition of the vaccine against the infection caused by *H. influenzae* type b includes capsular polysaccharide polyribosylribitol phosphate (PRP), synthesized by *H. influenzae* type b in significant quantities during the growth on liquid growth mediums [12]. It is known that one of the most important steps in the production of vaccines is cultivation of the producer under optimal conditions, which allows obtaining the maximum yield of the target product with minimal costs.

Previously the employees of the FSUE “Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of FMBA, Russia had isolated a strain identified as *H. influenzae* type b. This strain had been deposited under the registration number B-7884 in the National collection of pathogenic microorganisms and cell cultures «GKMP-Obolensk» for the purposes of the national patent proceeding [13] as a result of which a patent for the invention was obtained [14]. The conditions for obtaining of Master and Working cell bank had been selected as well as the methods for controlling had been worked out. At the next step, it is planned to select the optimal component composition of the liquid growth medium, as well as the conditions for cultivation of B-7884 strain to obtain the maximum amount of the capsular polysaccharide polyribosylribitol phosphate (PRP).

The **aim** of the investigation is to analyze and summarize the literature data on the cultivation peculiarities of *haemophilus influenzae* of b-type strains.

Materials and methods. In the process of selecting the material for writing a review article, we used the databases Google Patents, Science Research Portal, Google Scholar, ScienceDirect, CiteSeer, Publications, ResearchIndex, Ingenta, PubMed, KEGG, etc. The search of articles was conducted by the following keywords: «*Haemophilus influenzae* type b», «PRP», «cultivation», «culture medium», «fermenter».

Results and discussion. The selection of optimal conditions for cultivation is primarily associated with the physiological characteristics of the producer and the ways of synthesis of the target product.

Considering the fact that polyribosylribitol phosphate is a capsular polysaccharide of *H. influenzae* type b, the issues associated with its biosynthesis depending on the growth phase of the producer, release into the growth medium, the influence of biosynthetic precursors, the dependence of the formation of the polysaccharide on the rate of biomass accumulation are especially interesting [15].

Thus, back in the 70s of the previous century it was found out that the synthesis of PRP in six of the investigated *H. influenzae* type b strains occurred simultaneously with the growth of culture and the maximum level of

accumulation of the target product was observed in the early stationary growth phase [16].

Capsular polysaccharide is synthesized exogenously, its release into the fermentation broth occurs a few hours after the end of biosynthesis. The rate of release of the polysaccharide in the exponential growth phase is individual for each strain. The release of PRP into the fermentation broth occurred spontaneously, but the authors of the work [16] emphasize that it is advisable to heat or treat the biomass by ultrasound for speeding up the release of the polysaccharide and increase the amount of synthesized PRP.

Another interesting approach to increasing the amount of a detachable polysaccharide is described in the patent [17]. The authors proposed to lower the temperature to room temperature after the fermentation and hold the fermentation broth in such conditions. It was shown that the amount of synthesized PRP was 330 µg/ml after 12 h of cultivation, and keeping at room temperature for several hours after 16 h of cultivation allowed to increase the antigen level to 480 µg/ml. The researchers focus their attention on the necessity to start cooling at a certain time: earlier – losses on polysaccharide are possible, and later on cell lysis and additional contamination may occur [17].

The researchers also note that the intensification of the target product biosynthesis is possible either directly by increasing the level of biomass (for example, by introducing sources of carbohydrates or increasing the aeration) or by increasing the biosynthetic capacity of the strain. For example, buffering of the growth medium led to increasing elongation of the producer stationary phase with a subsequent increase in the amount of synthesized PRP [16].

The scientists also studied the effect of precursors of biosynthesis on capsular polysaccharide formation during *H. influenzae* type b growth on the medium containing casein digest and yeast extract. It was shown that the maximum level of PRP (63–65 µg pentose PRP/ml) was observed with the addition of 0.1% ribose or 0.5% glucose, whereas without precursors it was 6.3–6.5 times lower. It is interesting, but adding ribitol did not influence the target product biosynthesis. The authors explain this phenomenon by the problems of transport and activation of this C₅-alcohol in the cell [16].

In the 60–70s of the 20th century, the scientists began to actively propose synthetic medium for the cultivation of *H. influenzae* strains. The first synthetic and semi-synthetic growth mediums, used for isolation and keeping the growth of *H. influenzae*, had a very complex, multicomponent composition, including many amino acids, vitamins, growth factors, inorganic salts. For example, the Herriott medium [18] contained 30 components. In another work [19], a synthetic growth medium consisting of 29 components was proposed.

At the same time, experiments were carried out to simplify its composition. Thus, R.D. Klein with co-authors proposed two modifications of the Herriott medium and the number of the components was reduced up to 13–14 positions [20].

In the 80s of the previous century, taking into account the metabolic characteristics of *H. influenzae* type b, the researchers began to pay considerable attention to the influence of hemin (factor X) and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD, factor V) on the growth of culture, and further on the biosynthesis of PRP [21].

Concerning the studies conducted today, several areas can be identified among them: searching for the most productive strains, selecting optimal conditions for cultivation, and studying the PRP biosynthesis in alternative medium without components of animal origin.

In one of the articles [22] the study of PRP biosynthesis by five strains of *H. influenzae* type b, isolated from diseased children and conditionally named H. inf. 1, H. inf. 2, H. inf. 3, ATF1 (ATCC 35540) and ATF2 (ATCC 10210) is described. It was shown that the maximum PRP synthesis (192 µg/ml) and the cell concentration (3.3×10^{11} CFU/ml) among the studied strains were characteristic for ATF2 strain during the growth on GC broth with the growth factors.

Similar studies were conducted for the other seven strains [23]. The strains isolated from sick children (Hib (1), Hib (2), Hib (3), Hib (4b), Hib (7b)) and the strains from the American collection ATCC 35540 (Hib (5s)) and ATCC 10210 (Hib (6s)) were studied.

It is interesting that in this case the maximum cell concentration (10^{13} CFU/ml) was observed for four strains on brain-heart infusion medium (BHI) supplemented with growth factors. The highest concentration of the synthesized polysaccharide (321 µg/ml) was characteristic for the strain ATCC 35540 (Hib (5s)) [23].

Different cultivation ways can also influence the yield of the capsular polysaccharide. Thus, Brazilian scientists [24] studied the features of growth and synthesis of PRP by strain GB 3291 during periodic fermentation for 24 h (option 1), during fermentation with feed of glucose (5 g/l) for 9 h (option 2) and during fermentation with replacing the growth medium after 12 hours of cultivation (option 3). It was shown that while using option 1, the concentration of PRP was 140 µg/ml and the accumulation of the target product was associated with the growth of the culture. Cultivation with the feed did not allow increasing the concentration of the target product due to the fact that additionally introduced glucose was practically not consumed by the culture. Using the third cultivation option allowed increasing the productivity to 87 mg of PRP/g of biomass in the second fermentation after replacement of the growth medium, whereas in the first option of cultivation it was 67 mg of PRP/g of biomass. It should be noted that the concentration of the polysaccharide itself did not differ substantially depending on the chosen fermentation way (at the relative variation of 0–17%) and was at the level of 132–155 µg/ml. Using the approaches to the mathematical description of the fermentation process proposed by Kono-Asai and Luedeken-Piret, the authors confirmed their assumption that the accumulation of the target product is directly related to the concentration of biomass [24].

The further studies by these scientists who estab-

lished the following patterns of PPP synthesis by the strain *H. influenzae* type b GB 3291 and were able to substantially increase its productivity are also interesting [25]. The biosynthesis of the polysaccharide is significantly influenced by pH regulation: maintaining the pH at a neutral level (7.2 ± 0.2) allows increasing the yield of PRP. Thus, the synthesis of the antigen continued and increased with pH regulation and attainment to the stationary growth phase, in contrast to the variant without pH regulation, where the increase of antigen amount was observed only in the exponential growth phase. The cells rapidly catabolized feed in the form of glucose (with pH adjustment) with the simultaneous synthesis of biomass and antigen. When the culture reached the stationary growth phase, glucose consumption slowed down, but the synthesis of the polysaccharide was actively continued. At the same time, after reaching the stationary growth phase (10 h), the feed was directly converted into a polysaccharide (under the condition of pH regulation). In addition, it was shown that the amount of synthesized polysaccharide was 943.3 µg/ml when the oxygen saturation was 30% with pH control. The amount of synthesized polysaccharide was 124% higher than the traditional synthesis with unchanged aeration (420.8 µg/ml). Maintaining the partial pressure and pH at a certain level led to an elongation of the exponential and stationary growth phases and, correspondingly, to an increase of PRP formation. The authors suggest that pH regulation and the maintenance of aeration at a certain level also positively influence the expression of genes which are responsible for the synthesis of the capsular polysaccharide [25].

Modern world trends require that biotechnologists should develop new approaches to the selection of a growth medium for the cultivation of producers, especially those that require components of animal origin for their activity. *H. influenzae* type b also relates to such microorganisms, for the cultivation of which media with animal components are often used (e.g. brain-heart infusion medium, chocolate agar with blood, peptones of the animal origin). In addition, gem is the growth factor of *H. influenzae* type b [26, 27], which is necessarily introduced into the growth medium in the form of a solution of hemin chloride. Therefore, increasingly frequently scientists pay attention to the selection of alternative growth medium based on plant components, for example, peptones. Thus, most of the modern patents relating to the biosynthesis of PRP of *H. influenzae* type b are devoted to the selection of the optimal composition of such growth medium.

The information about the component composition of the growth medium containing inorganic salts, glucose, yeast extract, some amino acids, hemin and NAD, as well as peptone of plant origin is provided in patent [28]. It was found out that the amount of polysaccharide collected from 700 liters of culture liquid was 70–80 g when a strain *H. influenzae* type b CS 68 was grown on this growth medium.

A modified soybean-peptone medium with a yeast

extract and an optimized concentration of hemin (30 mg/l) and NAD (15 mg/l) was described in one of the works [29]. The synthesis of PRP increased up to 980 µg/ml under conditions of forced aeration and pH control.

In addition to screening the optimal composition of the growth medium, scientists pay special attention to the selection and receiving of highly active PRP producers. Thus, in the patent [30] the authors described a heterogeneous population of *H. influenzae* serotype b, which contains encapsulated and noncapsulated bacteria. It was shown that white and gray colonies, significantly different in productivity, were distinguished after 18–24 h of cultivation on selective solid nutrient media. Thus, white colonies synthesized 3–5 times more PRP compared to gray colonies and their productivity persisted for 4 generations. A synthetic solid nutrient medium containing plant peptone, yeast extract, inorganic salts, carbohydrates, growth factors, was proposed for the selective isolation of highly productive white colonies. The scientists suggested that the cells forming white colonies contained at least two locuses, which were responsible for the synthesis of the target antigen [30].

The authors of another patent [31] used a strain with similar genetic characteristics. They examined the encapsulated strain *H. influenzae* type b, containing at least two copies of the locus (the size between 17 and 18 kDa) in the genetic code that group together the genes responsible for the synthesis and expression of the polysaccharide capsule. Using the chemical medium proposed in the patent made it possible to obtain a stable strain in 20 generations. The scientists conducted significant work studying the influence of the constituent composition of the growth medium on the PRP biosynthesis, as well as on the selection of components of non-animal origin for its composition [31]. During the selection of a growth medium, the researchers excluded proteins from its composition, which, in their opinion, greatly facilitates the purification of the target product and eliminates using of an antifoam agent. It has been established that a range of amino acids must be present in the growth medium for the cultivation of the studding strain, while the possibility of regulation of the polysaccharide biosynthesis by the concentration of aspartic acid, asparagine and glutamine was shown [31]. The concentration of these amino acids was chosen in such a way as to direct the metabolism of the cell to the production of the capsular polysaccharide. In addition, the positive effect of a range of vitamins in the growth medium on the production of the target product is described in patent [31].

During the replacement of animal components in the growth medium for an alternative, the question arises of the source of the hemin for *H. influenzae* type b, for which this porphyrin is an indispensable growth factor. The replacement of animal-based hemin on disodium salt of protoporphyrin or synthetic protoporphyrin IX at concentrations of 0.25 and 2.0 mg/l is proposed in the patent [31].

Using mixtures of substrates for cultivation is an interesting approach to increasing the synthesis of biomass

or the target product [32, 33]. It has been shown that the strain described in the patent [31] is capable to catabolize glucose, fructose, galactose, glycerol, xylose, ribose, fucose, sialic acid and lactate, and two or more carbon sources, such as glucose (12–16 g/l) and lactate (0.5–10 g/l), can be used for its cultivation. In our opinion, the study of this issue and work in this direction can be promising.

In addition, an important factor influencing the biosynthesis of the target product is the carbon/nitrogen ratio in the growth medium [34, 35]. Thus, it is emphasized in the patent [31] that the ratio of peptone and yeast extract should be more or equal to 1, and the content of total nitrogen – more than 0.8 g/l.

The authors of the work [36] studied the effect of dextrose and yeast extract concentration on the PRP synthesis of *H. influenzae* type b ATCC No. 10211. Two growth mediums were modified: the medium containing soy peptone and yeast extract (MP) as the main components, as well as the medium containing the casitone and yeast extract (CY) [37]. The modification consisted of a variation in the concentration of dextrose and yeast extract in the range 0–10 and 0–7.5 g/l, respectively. Experiments on the selection of the optimal concentration of the carbon and nitrogen source were carried out in Erlenmeyer flasks containing 1.0 L of the growth medium of the corresponding variant on a shaker incubator at 200 rpm at 37°C for 15 h. It was found out that the maximum PRP synthesis (453–511 mg/l) was observed at the concentration of dextrose and yeast extract 2.5 and 6 g/l, respectively, during the cultivation on MP medium. When the strain was cultured on a modified MP medium with a selected optimal concentration of yeast extract and glucose in a 50 l fermenter, the yield of the polysaccharide was 524 mg/l. Thus, it is necessary to take into account the C/N ratio when choosing the optimal composition of the growth medium for the cultivation of the producer.

The optimization of conditions for cultivation of *H. influenzae* type b using mathematical methods of planning was published in several articles [38]. Thus, Indian scientists selected the optimal composition of the growth medium for obtaining PRP using Plackett-Burman's plan [39]. It was found out that the maximum synthesis of the capsular polysaccharide (183 µg/ml) by the test strain was observed on a selected medium of the following composition (g/l): glutamate acid – 2, yeast extract – 15, cysteine – 0.008, dextrose – 7.5, NAD – 0.008, hemin – 0.02, NaCl – 4, NH₄Cl – 0.85, Na₂HPO₄ – 4.5, KCl – 0.11, MgSO₄ 7H₂O – 0.6. Some other authors used the central compositional plan and the methodology of the response surface to select the optimal values of external factors (temperature, pH, stirring speed) affecting the amount of generated biomass *H. influenzae* type b ATCC 10211 [40]. It was found out that at the temperature 35°C, a stirring 250 rpm and pH 8.5, the level of dry biomass was 5471 mg/l.

The results of improving the technology of obtaining PRP, as well as its scaling are presented in works [41, 42]. On a pilot scale (2 l of growth medium) the authors modified the medium based on casamino acids

and yeast extract, changing the concentration of glucose, yeast extract, hemin and NAD in its composition. Cultivation on a medium with an optimally selected composition of components allowed increasing the yield of PRP up to 1050 µg/ml, whereas when scaling to 50 l, maintaining the pH at 7.5 and partial pressure of oxygen 30%, the resulting polysaccharide concentration was 1160 µg/ml.

Russian scientists have proposed several variants of nutrient media for the cultivation of *H. influenzae* type b. Thus, in the patent belonging to Rostov Scientific Research Institute of Microbiology and Parasitology [43], a fairly simple growth medium based on casamino acids is described. Other authors took Klein's medium with the addition of NAD and hemin (synthetic medium) and insertion of casein peptone and glucose (semisynthetic medium) as a basis [44]. It was found out that the productivity of strain 326 on a synthetic and semisynthetic medium was 90–150 µg/ml and 80–130 µg/ml, respectively. Synthetic and semisynthetic growth medium (based on aminopeptide) for the cultivation of strain 267 (Mech No. 1) was also used by the authors of the patent [45] belonging to Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera. Another patent [46] describes the composition of a growth medium for cultivating *H. influenzae* type b which advantage is its low cost. The composition of the growth medium includes 11 components (in g/l: NaCl – 5.8; MgCl₂ – 0.2; CaCl₂ – 0.022; KH₂PO₄ – 2.720; K₂HPO₄ – 3.480; glucose – 5.000; hemin – 0.01; NAD – 0.004; calcium pantothenate – 0.004; thiamine – 0.004 ml; aminopeptide – 300 ml), and its preparation includes 8 stages. The details of the cultivation of *H. influenzae* type b on semisynthetic and synthetic medium are described in the articles of this author's collective [47, 48], and the regularities in

the synthesis of polysaccharide and biomass in these media, depending on the concentration of growth factors, are given in the work [49]. It was found out that increasing the concentration of hemin and NAD led to increasing the amount of biomass, but the amount of synthesized PRP was reduced.

The data on the conditions of cultivation of various strains of *H. influenzae* type b and quantifies the PRP biosynthesis are summarized in the table.

As it is seen from the data given in the table, various mostly semisynthetic growth media, different in composition, are used for the PRP biosynthesis by *H. influenzae* type b strains. As a result of optimization of their composition and scaling the technological step of cultivation for fermentation equipment, the synthesis of PRP for some strains was increased to 1000 µg/ml. It should be noted that in the domestic literature sources available to us, the maximum rate of the PRP synthesis is 130–150 µg/ml.

Conclusion. Analysis of the literature data has shown that the selection of the optimum growth medium composition (concentration of carbon, nitrogen (their ratio), growth factors) and the cultivation conditions themselves (necessity of feed addition, pH) allows achieving the maximum biosynthesis of capsular polysaccharide polyribosylribitol phosphate of *H. influenzae* type b and reducing the time of cultivation as a technological step of PRP production. In addition, it is necessary to take into account the economic component of the technological process. The results of this work will be taken into account in carrying out experimental work on the selection of the growth medium and conditions for cultivation of *H. influenzae* type b B-7884 strain both in the development of technology under laboratory conditions and in its scaling in pilot production.

Table 1 – PRP synthesis, depending on conditions of cultivation of *H. influenzae* type b strains

Strain	Growth medium	Cultivation method	Productivity, µg/ml	Reference
Mad	Brain heart infusion and trypticase-soybean basic medium	Not indicated	72.6	[16]
GB 3291	Soy peptone – 10.0 g, yeast extract dialysate – 5.0 g, K ₂ HPO ₄ – 2.5 g, Na ₂ HPO ₄ – 13.1 g, NaH ₂ PO ₄ – 3.3 g, glucose – 5.0 g, hemin chloride – 10.0 mg, NAD – 10.0 mg, distilled water – up to 1 l. Maintain the pH at 7.5 with 5.0 N NaOH	In a 13 l fermenter, the working volume of the growth medium is 7.4 l, the stirring speed is 100–600 rpm, 37°C, and the air supply rate is 2 l/min. Regulation of pH was not carried out	155.0	[24]
GB 3291	Soy peptone – 10.0 g, yeast extract dialysate – 5.0 g, K ₂ HPO ₄ – 2.5 g, Na ₂ HPO ₄ – 13.1 g, NaH ₂ PO ₄ – 13.1 g, NaH ₂ PO ₄ – 3.3 g, glucose – 5.0 g, hemin chloride – 30.0 mg, NAD – 15.0 mg, distilled water – up to 1 l. Maintain the pH at 7.2 with 5.0 M NaOH	In a 13 l fermenter, the working volume of the growth medium is 7.4 l, the stirring speed is 100–600 rpm, 37°C, the air supply rate is 0.25 air volume/volume of the growth medium per minute, the air saturation at the level 30%, maintaining the pH at 7.2	943.3	[25]

Table 1 continued

Strain	Growth medium	Cultivation method	Productivity, $\mu\text{g/ml}$	Reference
ATCC 35540 (Hib(5s))	Brain heart infusion with additives of 1% solution of hemoglobin and 1% solution of Isovitalex (contains NAD, vitamins and microelements)	In the flasks on shaker for 24 hours at 37°C in the presence of 5–10% CO ₂	321.0	[23]
ATF2 (ATCC 10210)	Pancreatic digest of casein – 7.5 g, peptic digest of animal tissue – 7.5 g, corn starch – 1.0 g, K ₂ HPO ₄ – 4.0 g, KH ₂ PO ₄ – 1.0 g, NaCl – 5.0 g, glucose – 5.0 g, water – up to 1 l, further added hemin – 10 mg/ml and IsovitaleX, containing 0.01/ml of NAD	In the flasks on shaker for 24 hours at 37 °C in the presence of 5–10% CO ₂ , pH 7.5	192.0	[22]
Mad	Casamino acids – 1%, yeast extract dialysate – 0.5%, NaCl and sodium phosphate buffer according to the formulation. Additions in the form of prepared horse blood in the amount of 1/1000 and III NAD in the amount of 1 $\mu\text{g/ml}$	Not indicated	133.0 (on pentose of PRP)	[16]
Not indicated	Glutamic acid – 2.0 g, yeast extract – 15.0 g, cysteine – 0.008 g, dextrose – 7.5 g, NAD – 0.008 g, hemin – 0.02 g, NaCl – 4.0 g, NH ₄ Cl – 0.85 g, Na ₂ HPO ₄ – 4.5 g, KCl – 0.11 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0.6 g, water – up to 1 l	6 l fermenter	180.0–183.0	[39]
A760705	L-glutamic acid – 1.3 g, Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O – 2.5 g, KCl – 0.09 g, NaCl – 6.0 g, NH ₄ Cl – 1.25 g, yeast extract – 10 g, cysteine – 0.015 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0.6 g, dextrose – 5.0 g, hemin – 0.005 g, NAD – 0.002 g, water – up to 1 l	Fermenter with a working volume of 40 l, aeration rate of 5 l per min, air saturation of 30%, stirring speed of 300–700 rpm, pH 7.0	480.0	[17]
Heterogeneous population (the productive white colonies were selected)	3-NAD – 5.0 mg, protoporphyrin IX – 1.0 mg, glucose – 20.0 g, yeast extract – 5.0 g, pea peptone – 7.42 g, sodium lactate in 60% aqueous solution – 1.49 ml, cystine – 0.07 g, tryptophan – 0.02 g, Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O – 31.14 g, NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O – 2.03 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0.4 g, CaCl ₂ · 2H ₂ O – 0.02 g, (NH ₄) ₂ SO ₄ – 1 g, water – up to 1 l	1 l fermenter, at (37 ± 1)°C, stirring, pressure 0.1 bar, pO ₂ – 30%, speed of air supply – 0.25 volume of air/volume of growth medium per min	719.0–904.0	[30]
ATCC10211	Casamino acids – 10.0 g/l, yeast extract dialysate – 2.5 g/l, glucose – 6.0 g/l, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.6. In addition on 1 l of growth medium was added NAD (0.015 g) and hemin (0.03 g)	In flasks (volume of fermentation broth – 2 l), at 36.5°C, 250 rpm, with a feeding solution of glucose and yeast extract	1050.0	[42]
		In 50 l fermenter, at the temperature of 36.5°C; the air supply rate is 0.6–0.8 air volume/volume of the nutrient medium per minute, stirring is 400–900 rpm, pH is 7.3, the air saturation is 30%, with a feeding solution of glucose and yeast extract	1160.0	
	The medium containing Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , NAD, hemin, soy peptone, yeast extract – 2.5 g/l, dextrose – 6 g/l	In flasks (volume of fermentation broth – 1 l), at 37°C, 200 rpm	453.0–511.0	[36]
		In a 50 l fermenter	524.0	

Table 1 continued

Strain	Growth medium	Cultivation method	Productivity, µg/ml	Reference
A capsular strain containing at least 2 copies of the locus in the genetic code	60% sodium lactate – 1.5 ml/l, K_2HPO_4 – 300 mg/l, KH_2PO_4 – 300 mg/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 368 mg/l, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ – 28620 mg/l, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ – 1870 mg/l, L-arginine – 87 mg/l, L-alanine – 134 mg/l, L-asparagine – 198 mg/l, L-lysine – 140 mg/l, L-glutamine – 220 mg/l, L-histidine – 78 mg/l, L-tryptophan – 200 mg/l, L-valine – 115 mg/l, L-isoleucine – 130 mg/l, L-leucine – 130 mg/l, L-tyrosine – 180 mg/l, L-phenylalanine – 165 mg/l, L-cystine – 61 mg/l, L-aspartic acid – 1065 mg/l, L-glutamic acid – 1471 mg/l, pyridoxine HCl – 4 mg/l, riboflavin – 0.2 mg/l, thiamine HCl – 4 mg/l, biotin – 4 mg/l, calcium pantothenate – 4.5 mg/l, uracil – 70 mg/l, hypoxanthine – 20 mg/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2.5 mg/l, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 20 mg/l, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 1 mg/l, $MnSO_4 \cdot H_2O$ – 5 mg/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 13 mg/l, the final pH is 7.2 ± 0.1 (adjusting with 10 N KOH solution) Additionally added: glucose – 512.8 g/l, solution of NAD, protoporphyrin – 0.25 g/l, ammonium hydroxide – 5 ml/l	In a 1000 l fermenter, at the temperature $(32 \pm 1)^\circ C$, pH (6.7 ± 0.2) (adjusting 2.5 N sodium hydroxide solution), pO_2 was maintained at 70% by cascading the stirring speed (from 100 up to 230 rpm), aeration increase (from 70 to 150 l/min), flow rate O_2 from 0 to 500 l/min. As necessary, antifoaming agent (4% Biospumex solution) was added	865.0	[31]
CS 68	L-glutamic acid – 1.5 g/l, ammonium sulfate – 1.25 g/l, Sodium phosphate dibasic dihydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) – 11.0 g/l, Sodium phosphate monobasic dihydrate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) – 3.3 g/l, yeast extract – 5 g/l, potassium chloride (KCl) – 100.0 mg/l, sodium chloride (NaCl) – 6 g/l, vegetable peptone extract – 10 g/l, NAD – 3.0 mg/l, hemin synthetic – 5.0 mg/l, glucose – 5.0 g/l, L-cysteine – 100 mg/l	At $37^\circ C$, the pH was maintained at 7.0	100.0–115.0	[28]
Eagan	Yeast extract – 5 g/l, casamino acids – 22.5 g/l, dibasic sodium phosphate – 14.4 g/l, dextrose – 5.59 g/l, hemin – 20 g, ammonium hydroxide (30%) – 0.1534 ml, 1% NAD – 0.6 ml	In a 40 l fermenter, 16–18 h	Data is not shown	[50]
B 423	Casamino acids broth – 10.0 g/l, glucose – 5.0 g/l, yeast extract dialysate – 2.0 g/l, hemin – 0.001 g/l, NAD – 0.008 g/l, vitamin B_{12} – 0.0005 g/l, pH 7.2–7.4.	In an atmosphere saturated with CO_2 , for 8–10 h	Data is not shown	[43]
326	The Klein medium with growth factors (hemin, NAD)	Fermenter of brand “Ankum” under conditions of forced aeration at $37^\circ C$, with constant stirring	90.0–150.0	[44]
	The Klein medium with growth factors (hemin, NAD), casein peptone – 20 g/l, glucose – 2 g/l		80.0–130.0	
267 (Mech №1)	Semisynthetic (based on aminopeptide) and synthetic growth medium	At $37^\circ C$ on a juggler at 200 rpm. The incubation was continued for 6 hours after the culture reached a stationary growth phase	50.0–100.0	[45]

Библиографический список

1. Almeida A.F., Trindade E., B. Vitor A., Tavares M. Haemophilus influenzae type b meningitis in a vaccinated and immunocompetent child // J Infect Public Health. 2017. No 10(3). P. 339–342. DOI: 10.1016/j.jiph.2016.06.001.
2. Sakata H., Adachi Y., Morozumi M., Ubukata K. Invasive Haemophilus influenzae infections in children in Kamikawa subprefecture, Hokkaido, Japan, 2006–2015: The effectiveness of H. influenzae type b vaccine // J Infect Chemother. 2017. No. 7. P. 459–462. DOI: 10.1016/j.jiac.2017.03.019.
3. Wood N., Menzies R., McIntyre P. Epiglottitis in Sydney before and after the introduction of vaccination against Haemophilus influenzae type b disease // Intern Med J. 2005. No. 35 (9). P. 530–535. DOI: 10.1111/j.1445-5994.2005.00909.x.
4. Slack M.P.E. A review of the role of Haemophilus influenzae in community-acquired pneumonia // Pneumonia. 2015. No. 6(1). P. 26–43. DOI.org/10.15172/pneu.2015.6/520.
5. Kelly D.F., Moxon E.R., Pollard A.J. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines // Immunology. 2004. No. 2. P. 163–174. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01971.x.
6. Briere E.C., Rubin L., Moro P.L., Cohn A., Clark T., Messonnier N. Prevention and control of Haemophilus influenzae type b disease: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP) // MMWR Recomm Rep. 2014. No. 63(RR-01). P. 1–14.
7. Davis S., Feikin D., Johnson H.L. The effect of Haemophilus influenzae type b and pneumococcal conjugate vaccines on childhood meningitis mortality: a systematic review // BMC Public Health. 2013. No. 13 Suppl. 3. P. 21. DOI: 10.1186/1471-2458-13-S3-S21.
8. Chongmelaxme B., Hammanee M., Phooaphirak W., Kotirum S., Hutubessy R., Chaiyakunapruk N. Economic evaluations of Haemophilus influenzae type b (Hib) vaccine: a systematic review // J Med Econ. 2017. No. 20(10). P. 1094–1106. DOI: 10.1080/13696998.2017.1359181.
9. Howie S.R., Oluwalana C., Secka O., Scott S., Ideh R.C., Ebruke B.E., Balloch A., Sambou S., Erskine J., Lowe Y., Corrah T., Adegbola R.A. The effectiveness of conjugate Haemophilus influenzae type b vaccine in the Gambia 14 years after introduction clinical infectious diseases // Clin Infect Dis. 2013. No. 57(11). P. 1527–34. DOI: 10.1093/cid/cit598.
10. Otczyk D.C., Cripps A.W. Vaccination for the control of childhood bacterial pneumonia – Haemophilus influenzae type b and pneumococcal vaccines // Pneumonia. 2013. No. 2(1). P. 2–15. DOI: 10.15172/pneu.2013.2/229.
11. Arvas A., Gur E., Bahar H., Torun M.M., Demirci M., Aslan M., Kocazeybek B. Haemophilus influenzae type b antibodies in vaccinated and non-vaccinated children // Pediatr Int. 2008. No. 50(4). P. 469–473. DOI: 10.1111/j.1442-200X.2008.02591.x.
12. World Health Organization: Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines // WHO Technical Report Series. 2000. N 897. URL: <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/haemophilus/en/> (дата обращения: 01.08.2017).
13. Салимова Е.Л., Конон А.Д., Трухин В.П., Петровский С.В., Красильников И.В. Haemophilus influenzae SPB тип b В-7884 – производственный штамм полисахаридных вакцин // Актуальная биотехнология. 2016. № 3 (18). С. 77–81.
14. Трухин В.П., Петровский С.В., Красильников И.В., Начарова Е.П., Евтушенко А.Э., Салимова Е.Л., Конон А.Д., Уйба С.В. Штамм Haemophilus influenzae SPB тип в – высокоактивный продуцент капсульного полисахарида полирибозилрибитолфосфата // Пат. 2624014. Рос. Федерация N 2016113658; заявл. 08.04.2016; опубл. 30.06.2017, Бюл. N 19. 8 с.
15. da Silva M.R., Andreia Freixo Portela C., Maria Ferreira Albani S., Rizzo de Paiva P., Massako Tanizaki M., Zangirolami T.C. Experimental design and metabolic flux analysis tools to optimize industrially relevant Haemophilus influenzae type b growth medium // Biotechnol Prog. 2017. DOI: 10.1002/btpr.2546.
16. Anderson P., Pitt J., Smith D.H. Synthesis and release of polyribophosphate by Haemophilus influenzae type b in vitro // Infect Immun. 1976. No 13(2). P. 581–589.
17. Hamidi A., Beurret M.F.; De Staat Der Nederlanden, Vert. Door De Minister Van Vws. Process for producing a capsular polysaccharide for use in conjugate vaccines // Patent US 7582459 B2. United States. 2009 Sep 1.
18. Herriott R.M., Meyer E.Y., Vogt M., Modan M. Defined medium for growth of Haemophilus influenza // J Bacteriol. 1970. No. 101(2). P. 513–516.
19. Wolin H.L. Defined medium for Haemophilus influenzae type b // J Bacteriol. 1963. No. 85. P. 253–254.
20. Klein R.D., Luginbuhl G.H. Simplified media for the growth of Haemophilus influenzae from clinical and normal flora sources // J Gen Microbiol. 1979. No. 113(2). P. 409–411.
21. Artman M., Domenech E., Weiner M. Growth of Haemophilus influenzae in simulated blood cultures supplemented with hemin and NAD // J Clin Microbiol. 1983. No. 18(2). P. 376–379.
22. Esmaily F., Aminian M., Tavangar A.R., Hadi A. Comparison of bacterial biomass and PRP production between different isolates of Haemophilus influenza type b (Hib) under different culture conditions // Archives of Razi Institute. 2011. No. 66(1). P. 43–49. DOI: 10.22092/ari.2016.103865.
23. Torabi M., Haadi A., Asli E., Aminian M., Esmaily F., Afshar M., Hatami A. A study on Haemophilus influenzae

- type b growth rate and capsule production in different media // Archives of Razi Institute. 2012. No. 67(1). P. 7–12. DOI: 10.22092/ARI.2016.103881.
24. Takagi M., Cabrera-Crespo J., Baruque-Ramos J., Zangirolami T.C., Raw I., Tanizaki M.M. Characterization of polysaccharide production of Haemophilus influenzae type b and its relationship to bacterial cell growth // Appl Biochem Biotechnol. 2003. No. 110(2). P. 91–100.
 25. Takagi M., Zangirolami T.C., Tanizaki M.M., Cabrera-Crespo J. Improvement of simple cultivation conditions for polysaccharide synthesis by Haemophilus influenzae type b // Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. 2007. P. 602–608. DOI: 10.1002/jctb.1377.
 26. Cope L.D., Yogev R., Muller-Eberhard U., Hansen E.J. A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme:hemoexin by Haemophilus influenzae type b // J Bacteriol. 1995. No. 177(10). P. 2644–2653. DOI: 10.1128/jb.177.10.2644-2653.1995.
 27. Wong J.C., Holland J., Parsons T., Smith A., Williams P. Identification and characterization of an iron-regulated hemoexin receptor in Haemophilus influenzae type b // Infect Immun. 1994. No. 62(1). P. 48–59.
 28. Ella K.M., Ramasamy V., Naidu M.G., Sarma A.D. Bharat Biotech International Limited. Non-alcoholic vaccine compositions free from animal- origin and process for preparation thereof // World intellectual property organization WO 2014009971 (A2). 2014.
 29. Takagi M., Cabrera-Crespo J., Zangirolami T.C., Raw I., Tanizaki M.M. Improved cultivation conditions for polysaccharide production by H. influenzae type b // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2006. No. 81(2). P. 182–188. DOI: 10.1002/jctb.1377.
 30. Maitre-Wilmotte G., Speck D., Rokbi B.; Sanofi Pasteur Sa. Culture medium for Haemophilus influenzae type b // Patent US 8673617 B2. United States 2014 Mar 18.
 31. Hir J.L., Loubiere P., Barbirato F., Lindley N.; Sanofi Pasteur. Method for producing Haemophilus Influenzae type b antigens // Patent US 9556464 (B2). United States 2017 Jan 31.
 32. Babel W. Bewertung von Substraten für das mikrobielle Wachstum auf der Grundlage ihres Kohlenstoff/Energie-Verhältnisses // Z. Allg. Mikrobiol. 1979. No. 19. P. 671–677. DOI: 10.1002/jobm.19790190910.
 33. Hagman M., Nielsen J.L., Nielsen P.H., Jansen J.I. Mixed carbon sources for nitrate reduction in activated sludge-identification of bacteria and process activity studies // Water Res. 2008. No. 42(6-7). P. 1539–1546. DOI: //doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.034.
 34. Fonseca R.R., Silva A.J., De França F.P., Cardoso V.L., Sérvulo E.F. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a Bacillus subtilis strain // Appl Biochem Biotechnol. 2007. No. 137–140(1–12). P. 471–486. DOI: 10.1007/s12010-007-9073-z.
 35. Kuttiraja M., Douha A., Valéro J.R., Tyagi R.D. Elucidating the effect of glycerol concentration and C/N ratio on lipid production using Yarrowia lipolytica SKY7 // Appl Biochem Biotechnol. 2016. No. 180(8). P. 1586–1600.
 36. Nojoomi F., Nahid A.P. Effect of culture media and their ingredients on PRP production by Haemophilus influenza // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2014. No. 3(11). P. 920–925.
 37. Ronald M. Atlas Handbook of Microbiological Media. Third Edition: CRC Press; 2004.
 38. Hamidi A., Kreeftenberg H., Pol L.V.D., Ghimire S., Wielen L.A.V.D., Ottens M. Process development of a new Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine and the use of mathematical modeling to identify process optimization possibilities // Biotechnol Prog. 2016. No. 32(3). P. 568–580. DOI: 10.1002/btpr.2235.
 39. Yeruva S., Mantha S., Tirumalaraju A., Rokkam S.R. Screening of medium components for polyribosylribitol phosphate production by Haemophilus influenzae type-b using Plackett-Burman design // Journal of Cell & Tissue Research. 2010. No. 10(3). P. 2349–2352.
 40. Momen S.B., Siadat S.D., Akbari N., Ranjbar B., Khajeh K. Applying central composite design and response surface methodology to optimize growth and biomass production of Haemophilus influenzae type b // Jundishapur J Microbiol. 2016. No. 9(6). P. 25246. DOI: 10.5812/jjm.25246.
 41. Nojoomi F., Siadat S.D., Salmanian A.H., Khoramabadi N. Improvement of large-scale PRP production by Haemophilus influenzae type b, using modified CY medium // J Fasa Univ Med Sci. 2012. No. 1(4). P. 182–186.
 42. Arsang A., Tabatabaie A., Vaziri F., Nejati M., Zolfaghari M.R., Fateh A., Jamnani F.R., Bahrmand A.R., Siadat S.D. Optimization of large scale production of Haemophilus influenzae type b polyribosyl-ribitol phosphate // Minerva Biotechnologica. 2017. No. 29(1). P. 17–23. DOI: 10.23736/S1120-4826.16.01855-3.
 43. Яговкин Э.А., Вачаев Б.Ф., Шепелев А.П., Головина С.В., Алешня В.В., Медуницын Н.В., Чупрынина Р.П., Немировская Т.И., Храмова Н.И. Способ получения антигенного препарата Haemophilus influenzae типа b (Hib) // Пат. 2185191. Рос. Федерация N 2001102923/13; заявл. 01.02.2001; опублик. 20.07.2002, Бюл. N 20. URL: http://www1.fips.ru/fips_serv1/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2185191&TypeFile=html (дата обращения: 01.08.2017)
 44. Ванеева Н.П., Елкина С.И., Апарин П.Г. Штамм бактерий Haemophilus influenzae В № 326, стабильный продуцент капсульного полисахарида // Пат. 2465316 Рос. Федерация N 2011140336/10; заявл. 05.10.2011; опублик. 27.10.2012, Бюл. N 30. 5 с.
 45. Елкина С.И., Сергеев В.В., Ванеева Н.П., Апарин П.Г., Львов В.Л., Ястребова Н.Е., Орлова О.Е. Штамм

- Haemophilus influenzae В МЕСН №1 – продуцент капсульного полисахарида – полирибозилрибитолфосфата // Пат. 2257412. Рос. Федерация N 2004109822/13; заявл. 01.04.2004; опубл. 27.07.2005, Бюл. N 21. 4 с.
46. Елкина С.И., Ванеева Н.П., Апарин П.Г., Львов В.Л., Орлова О.Е., Ястребова Н.Е. Питательная среда для культивирования бактерий Haemophilus influenzae типа b // Пат. 2258737. Рос. Федерация N 2003126461/13; заявл. 20.02.2005; опубл. 20.08.2005, Бюл. N 23. 5 с.
47. Orlova O.E., Vaneeva N.P., L'vov V.L., Iastrebova N.E., Elkina S.I., Sergeev V.V., Kalina N.G., Zakharova N.E. Cultivation of Haemophilus influenzae, serotype B, in amino peptide-based semisynthetic nutrient medium // Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2002. No.3. P. 56–58.
48. Orlova O.E. Dynamics of growth of Haemophilus influenzae serotype B and synthesis of capsular polysaccharide in the process of cultivation in a synthetic nutrient medium // Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2002. No. 2. P. 75–77.
49. Orlova O.E., Elkina S.I., Iastrebova N.E., Vaneeva N.P., Sergeev V.V., Kalina N.G., Tokarskaia M.M. Influence of nicotinamide adenine dinucleotide and hemin concentrations on the growth of Haemophilus influenzae type b and the synthesis of capsular polysaccharide // Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2005. No.4. P. 12–15.
50. Lance Gordon K., Connaught Lab. Haemophilus influenzae b polysaccharide exotoxoid conjugate vaccine / World intellectual property organization WO 8400300 (A1). 1984.

References

1. Almeida AF, Trindade E, B Vitor A, Tavares M. Haemophilus influenzae type b meningitis in a vaccinated and immunocompetent child. J Infect Public Health. 2017 May-Jun;10(3):339–42. DOI: 10.1016/j.jiph.2016.06.001.
2. Sakata H, Adachi Y, Morozumi M, Ubukata K. Invasive Haemophilus influenzae infections in children in Kamikawa subprefecture, Hokkaido, Japan, 2006–2015: The effectiveness of H. influenzae type b vaccine. J Infect Chemother. 2017 Jul;23(7):459–62. DOI: 10.1016/j.jiac.2017.03.019.
3. Wood N, Menzies R, McIntyre P. Epiglottitis in Sydney before and after the introduction of vaccination against Haemophilus influenzae type b disease. Intern Med J. 2005 Sep;35(9):530–5. DOI: 10.1111/j.1445-5994.2005.00909.x.
4. Slack MPE. A review of the role of Haemophilus influenzae in community-acquired pneumonia. Pneumonia. 2015;6(1):26–43. DOI.org/10.15172/pneu.2015.6/520.
5. Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. Immunology. 2004 Oct;113(2):163–74. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01971.x.
6. Briere EC, Rubin L, Moro PL, Cohn A, Clark T, Messonnier N. Prevention and control of Haemophilus influenzae type b disease: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2014 Feb 28;63(RR-01):1–14.
7. Davis S, Feikin D, Johnson HL. The effect of Haemophilus influenzae type b and pneumococcal conjugate vaccines on childhood meningitis mortality: a systematic review. BMC Public Health. 2013;13 Suppl 3:S21. DOI: 10.1186/1471-2458-13-S3-S21.
8. Chongmelaxme B, Hammanee M, Phooaphirak W, Kotirum S, Hutubessy R, Chaikunapruk N. Economic evaluations of Haemophilus influenzae type b (Hib) vaccine: a systematic review. J Med Econ. 2017 Oct;20(10):1094–106. DOI: 10.1080/13696998.2017.1359181.
9. Howie SRC, Oluwalana C, Secka O, Scott S, Ideh RC, Ebruke BE, Balloch A, Sambou S, Erskine J, Lowe Y, Corrah T, Adegbola RA. The effectiveness of conjugate Haemophilus influenzae type b vaccine in the Gambia 14 years after introduction clinical infectious diseases. Clin Infect Dis. 2013 Dec;57(11):1527–34. DOI: 10.1093/cid/cit598.
10. Otczyk DC, Cripps AW Vaccination for the control of childhood bacterial pneumonia – Haemophilus influenzae type b and pneumococcal vaccines. Pneumonia. 2013;2(1):2–15. DOI: 10.15172/pneu.2013.2/229.
11. Arvas A, Gur E, Bahar H, Torun MM, Demirci M, Aslan M, Kocazeybek B. Haemophilus influenzae type b antibodies in vaccinated and non-vaccinated children. Pediatr Int. 2008 Aug;50(4):469–73. DOI: 10.1111/j.1442-200X.2008.02591.x.
12. World Health Organization: Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. WHO Technical Report Series [Internet]. 2000. N 897. [cited 2017 Aug 01]. Available from: <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/haemophilus/en/>
13. Salimova EL, Konon AD, Truhin VP, Petrovskii SV, Krasilnikov IV. Haemophilus influenzae SPB tip b V-7884 proizvodstvennyj shtamm polisaharidnyh vakcin [Haemophilus influenzae SPB type b V-7884 – master seed strain of polysaccharide vaccines]. Actual biotechnology. 2016;3(18):77–81. Russian.
14. Trukhin VP, Petrovskii SV, Krasilnikov IV, Nacharova EP, Yevtushenko AE, Salimova EL, Konon AD, Ujba SV, inventor; SHtamm Haemophilus influenzae SPB tip v vysokoaktivnyj producent kapsulnogo polisaharida poliribozilribitolfosfata [The Haemophilus influenzae SPB type b strain is a highly active producer of the capsular polysaccharide polyribosyl ribitol phosphate]. Russian Federation RU 2624014. 2017 Jun 30. Russian.
15. da Silva MR, Andreia Freixo Portela C, Maria Ferreira Albani S, Rizzo de Paiva P, Massako Tanizaki M, Zangirami TC. Experimental design and metabolic flux analysis tools to optimize industrially relevant Haemophilus influenzae type b growth medium. Biotechnol Prog. 2017 Aug 25. DOI: 10.1002/btpr.2546.

16. Anderson P, Pitt J, Smith DH. Synthesis and release of polyribophosphate by *Haemophilus influenzae* type b in vitro. *Infect Immun*. 1976 Feb;13(2):581–9.
17. Hamidi A, Beurret MF, inventor; De Staat Der Nederlanden, Vert. Door De Minister Van Vws, assignee. Process for producing a capsular polysaccharide for use in conjugate vaccines. United States patent. US 7582459 B2. 2009 Sep 1.
18. Herriott RM, Meyer EY, Vogt M, Modan M. Defined medium for growth of *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol*. 1970 Feb;101(2):513–6.
19. Wolin HL. Defined medium for *Haemophilus influenzae* type b. *J Bacteriol*. 1963 Jan;85:253–4.
20. Klein RD, Luginbuhl GH. Simplified media for the growth of *Haemophilus influenzae* from clinical and normal flora sources. *J Gen Microbiol*. 1979 Aug;113(2):409–11.
21. Artman M, Domenech E, Weiner M. Growth of *Haemophilus influenzae* in simulated blood cultures supplemented with hemin and NAD. *J Clin Microbiol*. 1983 Aug;18(2):376–9.
22. Esmaily F, Aminian M, Tavangar AR, Hadi A Comparison of bacterial biomass and PRP production between different isolates of *Haemophilus influenza* type b (Hib) under different culture conditions. *Archives of Razi Institute*. 2011;66(1):43–9. DOI: 10.22092/ari.2016.103865.
23. Torabi M, Haadi A, Asli E, Aminian M, Esmaily F, Afshar M, Hatami A A study on *Haemophilus influenzae* type b growth rate and capsule production in different media. *Archives of Razi Institute*. 2012;67(1):7–12. DOI: 10.22092/ARI.2016.103881.
24. Takagi M, Cabrera-Crespo J, Barúque-Ramos J, Zangirolami TC, Raw I, Tanizaki MM. Characterization of polysaccharide production of *Haemophilus influenzae* type band its relationship to bacterial cell growth. *Appl Biochem Biotechnol*. 2003 Aug;110(2):91–100.
25. Takagi M, Zangirolami TC, Tanizaki MM, Cabrera-Crespo J. Improvement of simple cultivation conditions for polysaccharide synthesis by *Haemophilus influenzae* type b. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 2007;602–8. DOI: 10.1002/jctb.1377.
26. Cope LD, Yogev R, Muller-Eberhard U, Hansen EJ. A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme: hemopexin by *Haemophilus influenzae* type b. *J Bacteriol*. 1995 May;177(10):2644–53. DOI: 10.1128/jb.177.10.2644-2653.1995.
27. Wong JC, Holland J, Parsons T, Smith A, Williams P. Identification and characterization of an iron-regulated hemopexin receptor in *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun*. 1994 Jan;62(1):48–59.
28. Ella KM, Ramasamy V, Naidu MG, Sarma AD, inventor; Bharat Biotech International Limited, assignee. Non-alcoholic vaccine compositions free from animal-origin and process for preparation thereof. World intellectual property organization WO 2014009971 (A2). 2014 Jan 16.
29. Takagi M, Cabrera-Crespo J, Zangirolami TC, Raw I, Tanizaki MM Improved cultivation conditions for polysaccharide production by *H. influenzae* type b. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2006;81(2):182–8. DOI: 10.1002/jctb.1377.
30. Maitre-Wilmotte G, Speck D, Rokbi B, inventor; Sanofi Pasteur Sa, assignee. Culture medium for *Haemophilus influenzae* type b. United States patent US 8673617 B2. 2014 Mar 18.
31. Hir JL, Loubiere P, Barbirato F, Lindley N, inventor; Sanofi Pasteur, assignee. Method for producing *Haemophilus Influenzae* type b antigens. United States patent US 9556464 (B2). 2017 Jan 31.
32. Babel W. Bewertung von Substraten für das mikrobielle Wachstum auf der Grundlage ihres Kohlenstoff/Energie-Verhältnisses. *Z. Allg. Mikrobiol*. 1979;19:671–7. DOI: 10.1002/jobm.19790190910.
33. Hagman M, Nielsen JL, Nielsen PH, Jansen JL. Mixed carbon sources for nitrate reduction in activated sludge-identification of bacteria and process activity studies. *Water Res*. 2008 Mar;42(6-7):1539–46. DOI: //doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.034.
34. Fonseca RR, Silva AJ, De França FP, Cardoso VL, Sérvulo EF. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. *Appl Biochem Biotechnol*. 2007 Apr;137-140(1-12):471–86. doi: 10.1007/s12010-007-9073-z.
35. Kuttiraja M, Douha A, Valéro JR, Tyagi RD. Elucidating the effect of glycerol concentration and C/N ratio on lipid production using *Yarrowia lipolytica* SKY7. *Appl Biochem Biotechnol*. 2016 Dec;180(8):1586–600.
36. Nojoomi F, Nahid AP. Effect of culture media and their ingredients on PRP production by *Haemophilus influenzae*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2014;3(11):920–5.
37. Ronald M Atlas Handbook of Microbiological Media. Third Edition: CRC Press; 2004.
38. Hamidi A, Kreeftenberg H, V D Pol L, Ghimire S, V D Wielen LA, Ottens M Process development of a new *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine and the use of mathematical modeling to identify process optimization possibilities. *Biotechnol Prog*. 2016 May;32(3):568–80. DOI: 10.1002/btpr.2235.
39. Yeruva S, Mantha S, Tirumalaraju A, Rokkam SR Screening of medium components for polyribosylribitol phosphate production by *Haemophilus influenzae* type-b using Plackett-Burman design. *Journal of Cell & Tissue Research*. 2010 Dec;10(3):2349–52.
40. Momen SB, Siadat SD, Akbari N, Ranjbar B, Khajeh K Applying central composite design and response surface

- methodology to optimize growth and biomass production of Haemophilus influenzae type b. Jundishapur J Microbiol. 2016 Mar 1;9(6):e25246. DOI: 10.5812/jjm.25246.
41. Nojoomi F, Siadat SD, Salmanian AH, Khoramabadi N. Improvement of large-scale PRP production by Haemophilus influenzae type b, using modified CY medium. J Fasa Univ Med Sci. 2012;1(4):182–6.
 42. Arsang A, Tabatabaie A, Vaziri F, Nejati M, Zolfaghari MR, Fateh A, Jamnani FR, Bahrmand AR, Siadat SD. Optimization of large scale production of Haemophilus influenzae type b polyribosyl-ribitol phosphate. Minerva Biotechnologica. 2017 March;29(1):17–23. DOI: 10.23736/S1120-4826.16.01855-3.
 43. Yagovkin EA, Vachaev BF, Shepelev AP, Golovina SV, Aleshnya VV, Medunitsyn NV, Chuprynina RP, Nemirovskaya TI, Khramova NI, inventor. Sposob polucheniya antigennogo preparata Haemophilus influenzae tipa b (Hib) [A method for producing an Haemophilus influenzae type b (Hib) antigenic preparation]. Russian Federation RU 2185191. [Internet] 2002 Jul 20. [cited 2017 Aug 01]. Available from: http://www1.fips.ru/fips_servl/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2185191&TypeFile=html. Russian.
 44. Vaneeva NP, Elkina SI, Aparin PG, inventor. SHtamm bakterij Haemophilus influenzae V 326 stabilnyj producent kapsulnogo polisaharida [Strain of bacteria Haemophilus influenzae B No. 326, stable producer of capsular polysaccharide]. Russian Federation RU 2465316. 2012 Oct 27. Russian.
 45. Elkina SI, Sergeev VV, Vaneeva NP, Aparin PG, Lvov VL, Yastrebova NE, Orlova OE, inventor. SHtamm Haemophilus influenzae B MECH No 1 producent kapsulnogo polisaharida poliribozilribitolfosfata [Strain Haemophilus influenzae B MECH No. 1 – producer of capsular polysaccharide – polyribosylribitol phosphate]. Russian Federation RU 2257412. 2005 Jul 27. Russian.
 46. Elkina S.I, Vaneeva NP, Aparin PG, Lvov VL, Orlova OE, Yastrebova NE, inventor. Pitatel'naya sreda dlya kultivirovaniya bakterij Haemophilus influenzae tipa b [A growth medium for the cultivation of Haemophilus influenzae type b bacteria]. Russian Federation RU 2258737. 2005 Aug 20. Russian.
 47. Orlova OE, Vaneeva NP, L'vov VL, Iastrebova NE, Elkina SI, Sergeev VV, Kalina NG, Zakharova NE Cultivation of Haemophilus influenzae, serotype B, in amino peptide-based semisynthetic nutrient medium. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2002 May–Jun;(3):56–8.
 48. Orlova OE Dynamics of growth of Haemophilus influenzae serotype B and synthesis of capsular polysaccharide in the process of cultivation in a synthetic nutrient medium. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2002 Mar–Apr;(2):75–7.
 49. Orlova OE, Elkina SI, Iastrebova NE, Vaneeva NP, Sergeev VV, Kalina NG, Tokarskaia MM. Influence of nicotinamide adenine dinucleotide and hemin concentrations on the growth of Haemophilus influenzae type b and the synthesis of capsular polysaccharide. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2005 Jul–Aug;(4):12–5.
 50. Lance Gordon K, inventor; Connaught Lab, assignee. Haemophilus influenzae b polysaccharide exotoxoid conjugate vaccine. World intellectual property organization WO 8400300 (A1). 1984 Feb 2.

Благодарности. Авторский коллектив выражает благодарность заместителю директора по научной работе ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, д.м.н. Игнатьеву Георгию Михайловичу за помощь в написании статьи, а также за ценные советы и замечания.

Acknowledgments. The authors' team expresses gratitude to the deputy director of scientific work of FSUE SPbNIIVS FMBA of Russia, MD, professor Georgy M. Ignatiev for helping in writing the article, as well as for valuable advice and comments.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы:

Салимова Елена Леонидовна – начальник цеха «Комбинированные вакцины» Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России. Область научных интересов: биотехнология, технологии микробного синтеза, получение субстанций, выделение активного вещества. E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru

Конон Анастасия Дмитриевна – кандидат технических наук, ведущий инженер-технолог цеха «Комбинированные вакцины» Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производ-

Autors:

Salimova Elena Leonidovna – head of the department “Combined Vaccines” of the federal state unitary enterprise “The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia. Research interests: biotechnology, technologies of microbial synthesis, obtaining of substances, isolation of active substance. E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru

Konon Anastasiia Dmitrievna – Candidate of Sciences (Engineering), leading process engineer of the department “Combined Vaccines” of the federal state unitary enterprise “The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for

ству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России. Область научных интересов: биотехнология, технологии микробного синтеза, получение субстанций, выделение активного вещества. E-mail: a.d.konon@spbniivs.ru

Петровский Станислав Викторович – первый заместитель директора Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России. Область научных интересов: биотехнология, технологии микробного синтеза, технологии вирусных вакцин.

Трухин Виктор Павлович – директор Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России. Область научных интересов: биотехнология, технологии микробного синтеза, технологии вирусных вакцин.

Красильников Игорь Викторович – доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по международным отношениям Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России. Область научных интересов: биотехнология, технологии микробного синтеза, технологии вирусных вакцин, рекомбинантные вакцины. E-mail: i.v.krasilnikov@spbniivs.ru

the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia. Research interests: biotechnology, technologies of microbial synthesis, obtaining of substances, isolation of active substance. E-mail: a.d.konon@spbniivs.ru

Petrovskii Stanislav Viktorovich – first deputy director of the federal state unitary enterprise “The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia. Research interests: biotechnology, technologies of microbial synthesis, technologies of viral vaccines.

Truhin Viktor Pavlovich – director of the federal state unitary enterprise “The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia. Research interests: biotechnology, technologies of microbial synthesis, technologies of viral vaccines.

Krasilnikov Igor Viktorovich – Doctor of Sciences (Biology), professor deputy director for international relations of the federal state unitary enterprise “The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia. Research interests: biotechnology, technologies of microbial synthesis, technologies of viral vaccines, recombinant vaccines. E-mail: i.v.krasilnikov@spbniivs.ru

Поступила в редакцию: 07.09.2017

Отправлена на доработку: 20.09.17

Принята к печати: 28.09.2017

Received: 17.09.2017

Sent back for revision: 20.09.2017

Accepted for publication: 28.09.2017

УДК 547.458.88:582.734:543.5

ИЗУЧЕНИЕ РЕОЛОГИЧЕСКИХ И СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ ПЕКТИНСОДЕРЖАЩИХ РАСТВОРОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ РЯБИНИКА РЯБИНОЛИСТНОГО

С.Л. Аджиахметова, Л.П. Мыкоц, Н.М. Червонная,
И.И. Харченко, Н.А. Туховская, Э.Т. Оганесян

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России,
357532, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11
E-mail: similla503@mail.ru

В настоящее время очень важным является поиск новых сырьевых источников биологически активных веществ растительного происхождения. Широкое распространение, относительная легкость выделения и высокая физиологическая активность сделали привлекательным практическое применение пектинов. Поэтому в настоящее время проводится интенсивное изучение связи между структурой и физико-химическими свойствами пектиновых полисахаридов, а также расширяются исследования по изучению сорбционных и комплексообразующих свойств пектина. **Целью** работы явилось изучение реологических свойств водных растворов пектиновых веществ, полученных из листьев рябинника рябинолистного (*Sorbaria sorbifolia* (L.)). **Материалы и методы.** Выделение полисахаридов из листьев рябинника рябинолистного проводили по фракциям, используя метод Н.К. Кочеткова и М. Sinner. На основе данных эксперимента нами была проведена оценка адсорбционной способности. Из данных литературы следует, что процесс адсорбции может быть описан уравнением Фрейндлиха или Ленгмюра. Применимость конкретного уравнения зависит от природы адсорбента и концентрации адсорбтива. **Результаты и обсуждение.** В ходе работы были выделены полисахариды из листьев рябинника рябинолистного и изучены их некоторые физико-химические свойства. Была определена средняя молекулярная масса пектиновых веществ, которая составила 32923. Изучено влияние pH среды на вязкость растворов пектиновых веществ и установлено, что при pH 5,2 наблюдается отчетливо выраженный минимум вязкости. В такой среде молекулы пектиновых веществ электронейтральны и полиэлектролит находится в изоэлектрическом состоянии. Полученные данные показывают, что максимальное связывание ионов Pb^{2+} пектином листьев рябинника рябинолистного в течение 50 минут составляет 60,0%. **Заключение.** Определение средней молекулярной массы и изоэлектрической точки позволяют установить возможность наиболее эффективного использования растительного сырья. Физические и технологические свойства пектиновых веществ зависят от их молекулярной массы. По величине полученных изотерм следует сделать вывод, что зависимость величины адсорбции к равновесной концентрации ионов свинца в большей степени подчиняется уравнению Ленгмюра.

Ключевые слова: листья рябинника рябинолистного, полисахариды, средняя молекулярная масса, изоэлектрическая точка, сорбция

Для цитирования:

Аджиахметова С.Л., Мыкоц Л.П., Червонная Н.М., Харченко И.И., Туховская Н.А., Оганесян Э.Т.
ИЗУЧЕНИЕ РЕОЛОГИЧЕСКИХ И СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ ПЕКТИНСОДЕРЖАЩИХ РАСТВОРОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ РЯБИНИКА РЯБИНОЛИСТНОГО. Фармация и фармакология. 2017;5(5):442-456.
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-442-456
© Аджиахметова С.Л., Мыкоц Л.П., Червонная Н.М., Харченко И.И., Туховская Н.А., Оганесян Э.Т.

For citation:

Adjiahmetova S.L., Myikots L.P., Chervonnaya N.M., Harchenko I.I., Tuhovskaya N.A., Oganessian E.T.
THE STUDY OF RHEOLOGICAL AND SORPTION PROPERTIES OF PECTINESTERASE SOLUTIONS FROM THE LEAVES OF SORBARIA SORBIFOLIA. Pharmacy & Pharmacology. 2017; 5(5): 442-456. (In Russ.)
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-442-456

THE STUDY OF RHEOLOGICAL AND SORPTION PROPERTIES OF PECTINESTERASE SOLUTIONS FROM THE LEAVES OF *SORBARIA SORBIFOLIA*

*S.L. Adjiahmetova, L.P. Myikots, N.M. Chervonnaya, I.I. Harchenko,
N.A. Tuhovskaya, E.T. Oganessian*

*Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State
Medical University, 11, Kalinin ave., Pyatigorsk, Russia, 357532
E-mail: similla503@mail.ru*

Currently, searching for new sources of raw materials of biologically active substances of plant origin is very important. Widespread distribution, relatively easy isolation and high physiological activity have made the practical use of pectins attractive. That is why nowadays an intensive study of the relationship between the structure and physico-chemical properties of pectin polysaccharides is being carried out, and the studies of the sorption and complexing pectin properties are also being expanded. **The aim of the work** was to study rheological properties of aqueous solutions of pectin substances obtained from the leaves of *Sorbaria sorbifolia* (L.). **Materials and methods.** Secretion of polysaccharides from the leaves of *Sorbaria sorbifolia* was carried out fraction by fraction on the basis of N. K. Kochetkov and M. Sinner's method. We evaluated the adsorption capacity basing on the experimental data. From the literature data it follows that the adsorption process can be described by Freundlich's or Langmuir's equation. The applicability of the particular equation depends on the nature of the adsorbent and the concentration of the adsorbate. **Results and discussion.** In the course of the work polysaccharides were isolated from the leaves of *Sorbaria sorbifolia* and some of their physico-chemical properties were studied. The average molar mass of pectic substances was determined as 32923. The influence of the pH medium on the viscosity of solutions of pectin substances was studied and it was found out that a distinct minimum viscosity is observed at pH 5.2. In such an environment the molecules of pectic substances are electrically neutral and the polyelectrolyte is in the isoelectric state. The obtained data show that the maximal binding of Pb^{2+} ions by pectin leaves of *Sorbaria sorbifolia* within 50 minutes is 60.0%. **Conclusion.** The determination of the average molar mass and the isoelectric point makes it possible to specify the possibility of the most effective use of plant raw materials. Physical and technological properties of pectic substances depend on their molar mass. By the value of the obtained isotherms we should arrive at the conclusion that the dependence of the adsorption amount on the equilibrium concentration of lead ions is more subject to Langmuir's equation.

Keywords: leaves of *Sorbaria sorbifolia*, polysaccharides, average molar mass, isoelectric point, sorption

Введение. В настоящее время очень важным является поиск новых сырьевых источников биологически активных веществ растительного происхождения. В отличие от синтетических веществ лекарственные растения и препараты на их основе обладают широким спектром фармакологического действия в сочетании с очень низкой токсичностью.

Пектины – это высокомолекулярные соединения бесспорно растительного происхождения, которые признаны абсолютно нетоксичными и фармакологически безопасными биологически активными веществами. Особенно эффективны при заболеваниях, связанных с нарушениями липидного и углеводного обменов. Пектиновые вещества используются при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, сахарном диабете, атеросклерозе, гемофилии, заживлении ран и ожогов [1 – 4].

Практическое применение пектинов обусловлено широким распространением, относительной легкостью выделения и высокой фармакологической активностью. В настоящее время проводится интенсивное изучение связи между структурой и физико-химическими свойствами пектиновых полисахаридов, а также расширяются исследования по изучению комплексующих свойств пектина [5 – 7].

Рябинник рябинолистный относится к семейству

Розоцветные (*Rosaceae* DC). Что касается распространения, то можно отметить следующее, представители данного семейства широко распространены по всему земному шару, но наибольшим разнообразием характеризуются умеренные и субтропические пояса обоих полушарий, в особенности – умеренный пояс Северного полушария.

Семейство охватывает широкий спектр жизненных форм растений: листопадные и вечнозеленые деревья, листопадные и вечнозеленые кустарники и кустарнички, многолетние и однолетние травы. Листья очередные, редко – супротивные, простые или сложные, большей частью с прилистниками.

В качестве объекта исследования были использованы листья рябинника рябинолистного, собранные в июле – августе 2016 г.

Целью работы явилось изучение реологических свойств водных растворов пектиновых веществ, полученных из листьев рябинника рябинолистного (*Sorbaria sorbifolia* (L.)).

Материалы и методы. Выделение полисахаридов из листьев рябинника проводили по фракциям, используя метод Н.К. Кочеткова и М. Sinner: I – ВРПС (водорастворимые полисахариды), II – ПВ (пектиновые вещества), III – Гц А (гемицеллюлоза А) и IV – Гц Б (гемицеллюлоза Б) [1, 8–10] (рис. 1).

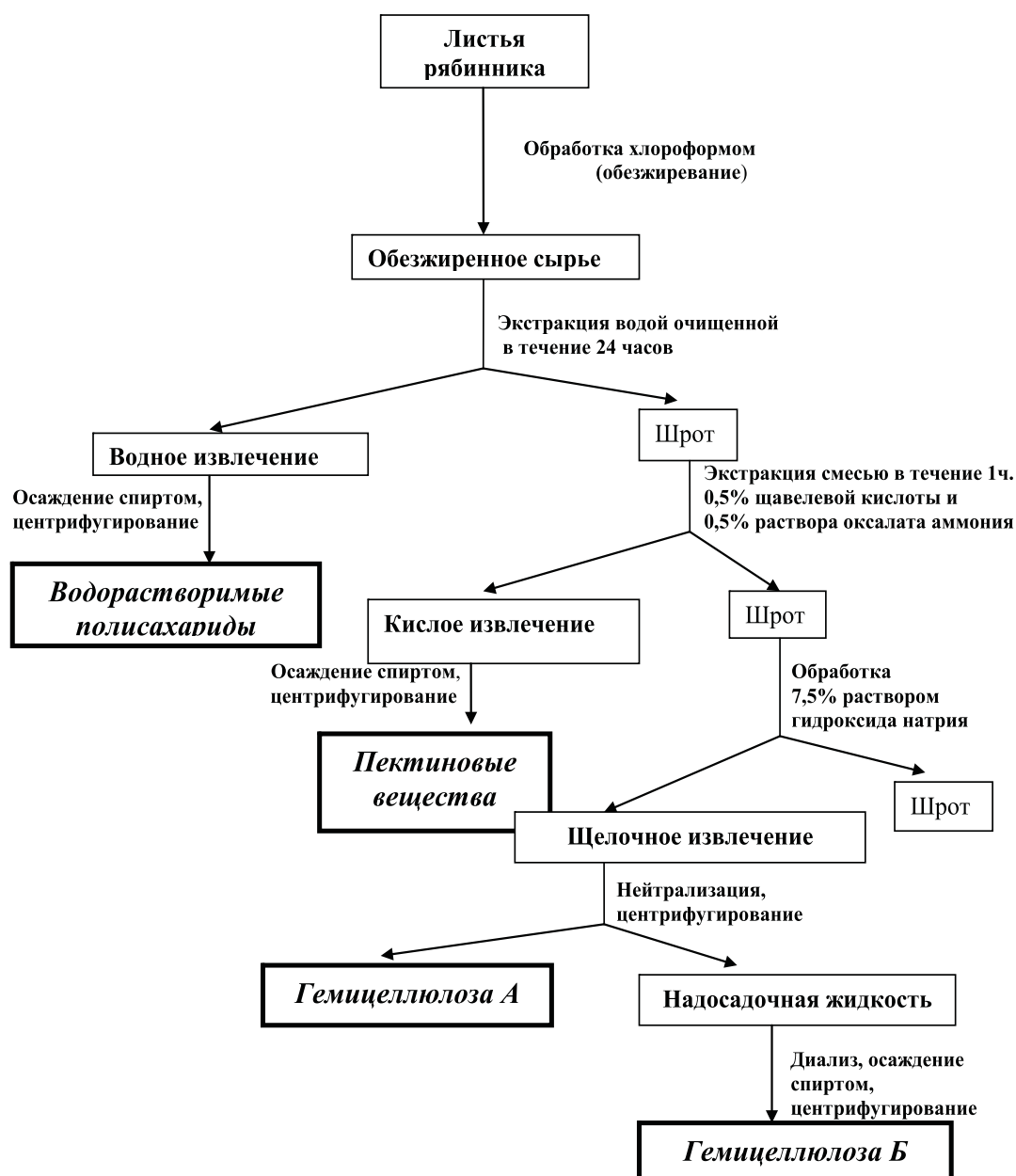


Рисунок 1 – Схема выделения полисахаридных комплексов из листьев рябинника рябинолистного

С помощью капиллярного вискозиметра Освальда определяли среднюю молекулярную массу [10–12].

Измеряли время истечения воды (t_0), растворов ПВ (t), рассчитывали относительную вязкость (η) с учетом плотности (ρ_0 , ρ) растворов (формула 1):

$$\eta = \frac{t \times \rho}{t_0 \times \rho_0} \quad (1)$$

По величине характеристической вязкости ($[\eta]$) и уравнению Марка-Куна-Хаувинка рассчитали среднюю молекулярную массу (M) (формула 2):

$$[\eta] = K \times M^\alpha \quad (2)$$

Значения констант K и α взяты из литературных источников [1, 2].

На основе экспериментальных данных была оценена адсорбционная способность ПВ листьев рябинника [12–14].

Расчет экспериментальной величины адсорбции (А) проводили по формуле 3:

$$A = \frac{x}{m} = \frac{(C_0 - C_{\text{равн}}) \times V}{m}, \quad (3)$$

где: x – количество адсорбата, ммоль;
 m – единица массы адсорбента, г;
 C_0 – концентрация раствора до адсорбции ммоль/л;
 C – концентрация раствора после адсорбции, ммоль/л;
 V – объем раствора, л.

Результаты представлены в таблице 6.

По уравнению Фрейндлиха и Ленгмюра [13–16] проводили расчет адсорбции на поверхности раздела «твердое-жидкость».

Уравнение Фрейндлиха (формула 4):

$$A = KC^{\frac{1}{n}} \quad (4)$$

Для определения констант K и $\frac{1}{n}$ используют логарифмическую зависимость:

$$\ln A = \ln K + \frac{1}{n} \ln C, \quad (5)$$

где: A – экспериментальная величина адсорбции;

C – равновесная концентрация, ммоль/л.

Величины констант находят по графической зависимости $\ln \frac{x}{m} = f(\ln \Delta C)$, что представлено на рисунке 5.

Уравнение Ленгмюра (формула 6):

$$A = \frac{A_{\infty} \times C}{b + C}, \quad (6)$$

где: A_{∞} и b – константы;

C – концентрация адсорбата в состоянии адсорбционного равновесия, ммоль/л.

Для определения констант A_{∞} и b удобнее использовать линейную форму уравнения (формула 7):

$$\frac{1}{A} = \frac{b}{A_{\infty} \times C} + \frac{1}{A_{\infty}} \quad (7)$$

Для определения констант использовали графическую зависимость $1/A = f(1/\Delta C)$, представленную на рисунке 6.

Результаты и обсуждение. При гравиметрическом анализе было установлено, что количественно преобладают ВРПС и ПВ. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Процентный выход ПВ и ВРПС рябинника рябинолистного

Вид сырья, фракция	Листья рябинника
ПВ	9,2%
ВРПС	1,0%

Структуру и свойства высокомолекулярных соединений определяет средняя молекулярная масса, которая имеет непосредственную зависи-

мость от способа получения данного биополимера.

Результаты измерения представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты измерения вязкости водных растворов ПВ, полученных из рябинника рябинолистного

ПВ				
$C, \%$	$t, \text{сек}$	$\eta_{\text{отн}}$	$\eta_{\text{уд}}$	$\eta_{\text{пр}}$
H ₂ O	12,35			
0,05	14,20	1,15	0,15	3,00
0,10	16,18	1,31	0,31	3,10
0,20	20,30	1,64	0,64	3,20
0,40	29,55	2,39	1,39	3,48
0,80	57,35	4,64	3,64	4,55

Примечание:

C – концентрация раствора;

t – время;

$\eta_{\text{отн}}$ – вязкость относительная;

$\eta_{\text{уд}}$ – вязкость удельная;

$\eta_{\text{пр}}$ – вязкость приведенная

Относительная вязкость, характеризующая прирост вязкости раствора по сравнению с вязкостью растворителя, возрастает с ростом концентрации. Молекулы полимера начинают взаимодействовать между собой, и кри-

вая обращается выпуклостью к оси абсцисс. Возможно, происходит структурирование системы [2, 12, 13].

Графическая зависимость $\eta_{\text{отн}}$ от C представлена на рисунке 2.

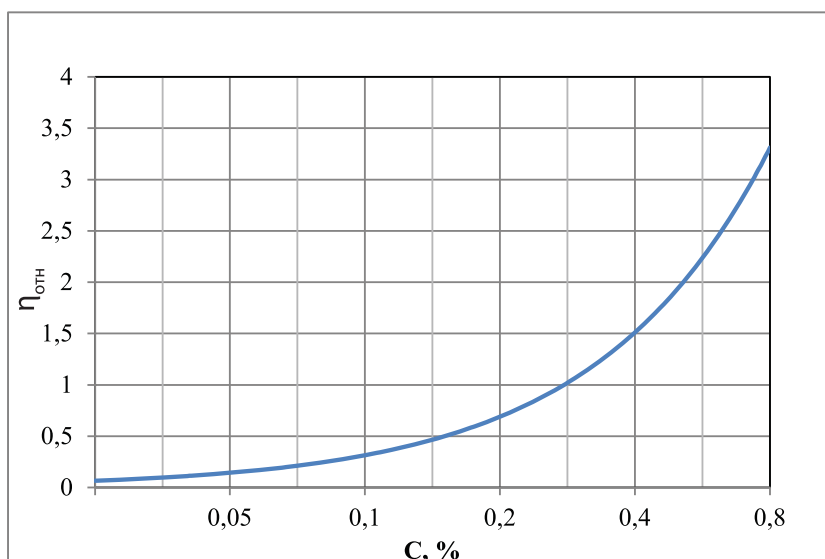


Рисунок 2 – Зависимость относительной вязкости ($\eta_{\text{отн}}$) от концентрации (C) растворов ПВ

Значение характеристической вязкости, которая отражает термодинамическое сопротивление потоку молекул биополимера, определяли по величине от-

резка, отсекаемого на оси ординат, с использованием уравнения зависимости $\eta_{\text{пр}} = f(C)$ определяли величину $[\eta]$. График зависимости изображен на рисунке 3.

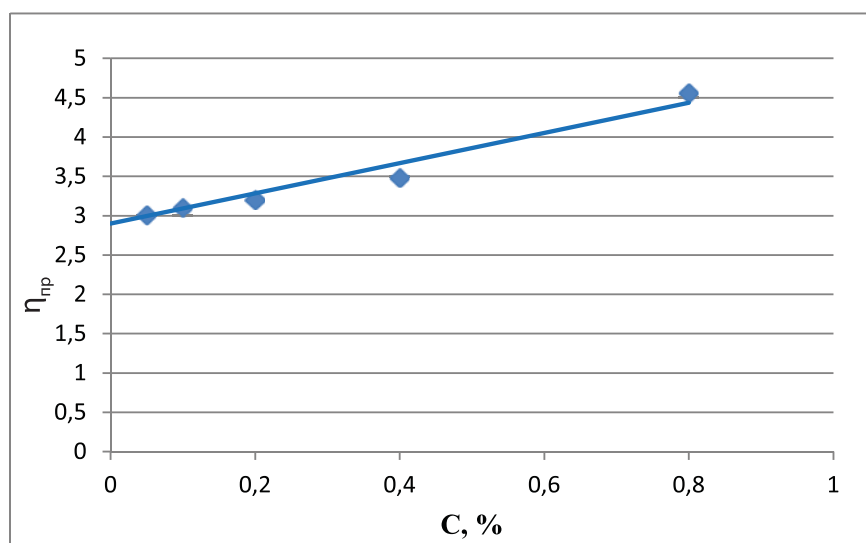


Рисунок 3 – Зависимость приведенной вязкости ($\eta_{\text{пр}}$) от концентрации (C)

Среднюю молекулярную массу рассчитывали с использованием величины характеристической вязкости и уравнения Марка-Куна-Хаувинка. При расче-

те данного показателя применяли литературные данные соответствующих значений: $K = 1,1 \cdot 10^{-5}$, $\alpha = 1,2$ [1]. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты определения молекулярной массы

Название сырья	Характеристическая вязкость	Средняя молекулярная масса, г/моль
	ПВ	
Листья рябинника	2,9	32923

Пектиновые вещества можно отнести к ионным полимерам. Степень диссоциации полярных групп, величина заряда связаны с pH среды. Макромолекулы растворимых в воде полиэлектролитов диссоциируют, отщепляя в раствор простые ионы, и образуют многозарядный полимерный ион. Реакцией среды определяется не только заряд иона, но и конформация молекул, связанная с изменяющимися свойствами полиэлектролита.

Поэтому, представляло интерес изучить влияние pH среды на вязкость растворов ПВ. Готовились буферные растворы с pH среды в интервале 3,2–5,7. К ним добавляли одинаковый объем 1% пектинсодержащего раствора и измеряли время истечения жидкости с помощью вискозиметра. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Зависимость времени истечения и вязкости растворов от pH среды

№	pH	t, сек	$\eta_{\text{отн}}$
1	–	12,96	–
2	3,2	15,17	1,171
3	3,7	15,10	1,165
4	4,2	15,23	1,175
5	4,7	15,02	1,159
6	5,2	14,59	1,126
7	5,7	14,95	1,154

Примечание:

$\eta_{\text{отн}}$ – вязкость относительная;
t – время

На графической зависимости $\eta_{\text{отн}}$ от pH среды (рис. 4) видно, что при pH 5,2 наблюдается отчетливо выраженный минимум вязкости. В такой среде

молекулы ПВ электронейтральны и полиэлектролит находится в изоэлектрическом состоянии. При этом молекулы свернуты в плотный клубок, который ока-

зывает меньшее сопротивление течению, чем распрямленная молекула.

При pH ниже и выше 5,2, вязкость увеличивает-

ся, так как молекула ПВ распрямляется, увеличивается ее объем. При pH<5,2 молекула заряжается положительно, при pH>5,2 – заряд отрицательный.

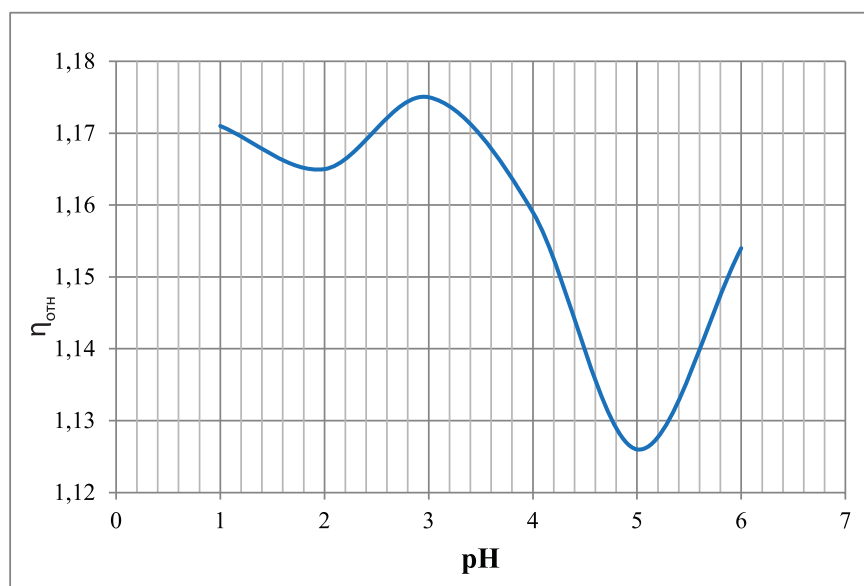


Рисунок 4 – Зависимость относительной вязкости ($\eta_{отн}$) 1% раствора ПВ от pH среды

Известно, что если полимер находится в изоэлектрическом состоянии, то меняются его физико-химические свойства: электропроводимость, осмотическое давление, степень денатурации и набухания, механическая прочность студней и др. [2, 13, 17]. Поэтому, установление изоэлектрической точки по-

лиэлектролита позволит влиять на свойства пектин-содержащих растворов.

Изучалась сорбционная способность полученных пектиновых веществ. В таблице 5 отражена зависимость концентрации ионов свинца от времени в процессе сорбции при контакте с исследуемым биополимером [18–20].

Таблица 5 – Изменение концентрации ионов свинца в водной фазе растворов ПВ листьев рябины рябинолистного

t, мин	Объем, мл	Содержание Pb ²⁺ , мг	Содержание Pb ²⁺ , ммоль/л	% связывания ионов Pb ²⁺	K ₁ C мг/г
0	4,75	98,4	47,5	-	-
10	2,4	49,7	24,0	49,5	324,7
20	2,2	45,6	22,0	53,7	352,0
30	2,1	43,5	21,0	55,8	366,0
40	2,0	41,4	20,0	57,9	380,0
50	1,9	39,4	19,0	60,0	393,3
60	1,9	39,4	19,0	60,0	393,3

Примечание:

t – время;

K₁C – комплексообразующая способность

Катион металла и пектин участвуют в реакции образования солей – пектатов металлов. С использованием метода изолирования Оствальда (табл. 6) учитывали изменение концентрации ионов металла с минимальным влиянием концентрации биополимера.

Применительно к этому методу, данная реакция протекает с избыточным количеством полиэлектролита, в данном случае пектина, при этом скорость сорбции пропорциональна концентрации иона металла, взятого в недостатке.

Таблица 6 – Результаты экспериментального нахождения величины адсорбции

t, мин	C _{Pb²⁺} , ммоль/л	ΔC, ммоль/л	A ₃ , ммоль/г	lnΔC	lnA ₃	1/ΔC	1/A ₃
ПВ листьев рябины рябинолистного							
0	47,5	-	-	-	-	-	-
10	24,0	23,5	15,67	3,16	2,75	0,043	0,064
20	22,0	25,5	17,00	3,24	2,83	0,039	0,059
30	21,0	26,5	17,67	3,28	2,87	0,038	0,057
40	20,0	27,5	18,33	3,31	2,91	0,036	0,055
50	19,0	28,5	19,00	3,35	2,94	0,035	0,053

Примечание:

t – время;

C – равновесная концентрация;

ΔC – разность концентраций растворов до и после адсорбции;

A₃ – экспериментальная величина адсорбции

Константу К находили по величине отрезка, отсекаемого прямой на оси ординат. Адсорбционный показатель ($\frac{1}{n}$) определен по тангенсу угла наклона прямой к оси абсцисс.

Найденные значения коэффициентов уравнения Фрейндлиха для ПВ из листьев рябинника рябинолистного составили $K=1,46$; $1/n=0,9$.

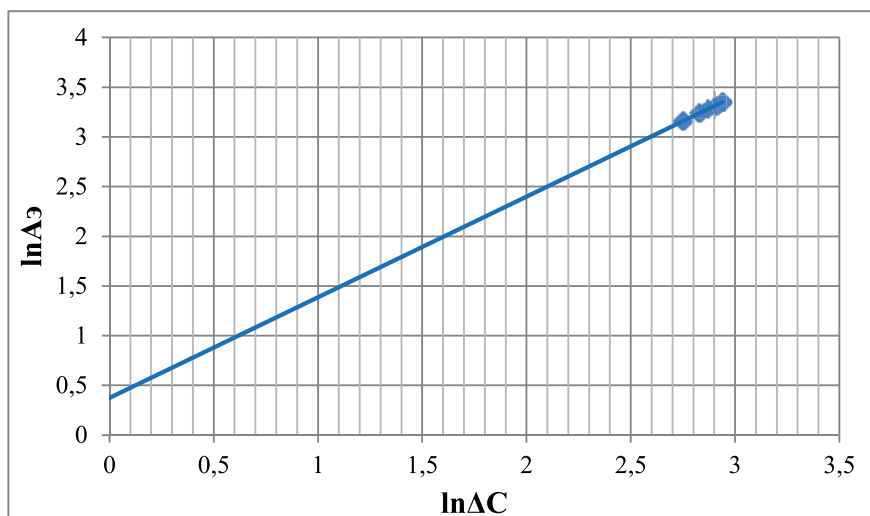


Рисунок 5 – Графическое определение констант уравнения Фрейндлиха для ПВ листьев рябинника рябинолистного

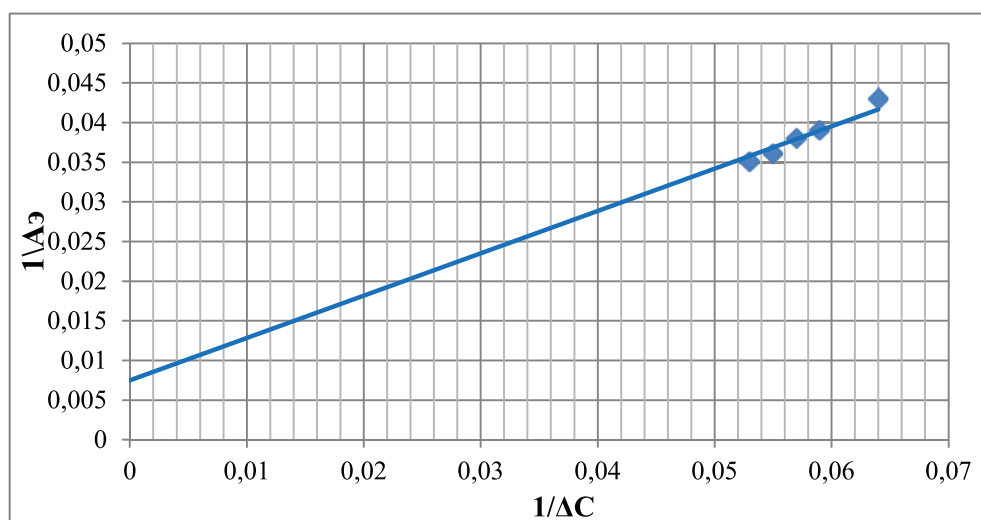


Рисунок 6 – Графическое определение констант уравнения Ленгмюра для ПВ листьев рябинника

Константа A_{∞} находилась по величине отрезка $OD = \frac{1}{A_{\infty}}$. Исходя из физического смысла коэффициента (b), что он равен концентрации при $\frac{A_{\infty}}{2}$, удвоили отрезок OD и нашли $OM = \frac{1}{b}$.

Найденные значения коэффициентов уравнения Ленгмюра для ПВ из листьев рябинника рябинолистного составили $A_{\infty}=133$; $b=167$. В таблице 7 представлены найденные величины адсорбции.

Таблица 7 – Соотношение экспериментальной величины адсорбции с расчетными

ΔC , ммоль/л	$A_{\text{э}}$, ммоль/г	$A_{\text{ф}}$, ммоль/г	$A_{\text{л}}$, ммоль/г	$A_{\text{э}}/A_{\text{ф}}$	$A_{\text{э}}/A_{\text{л}}$
ПВ листьев рябинника					
23,5	15,67	24,93	16,41	0,629	0,955
25,5	17,00	26,84	17,62	0,633	0,965
26,5	17,67	27,78	18,21	0,636	0,970
27,5	18,33	28,73	18,88	0,638	0,971
28,5	19,00	29,66	19,35	0,641	0,982
Средние величины:				0,64	0,97

Примечание:

ΔC – разность концентраций растворов до и после адсорбции;

$A_{\text{э}}$ – экспериментальная величина адсорбции;

$A_{\text{ф}}$ – адсорбция по уравнению Фрейндлиха;

$A_{\text{л}}$ – адсорбция по уравнению Ленгмюра

Результаты показали, что максимальное связывание ионов Pb^{2+} пектином листьев рябины составляет 60,0%. В пересчете на 1 г сорбента соответственно равно 39,4 мг ионов свинца.

Заключение. В результате исследования определена средняя молекулярная масса, которая равна 32923 г/моль. Определение средней молекулярной массы и изоэлектрической точки позволяют устано-

вить возможность наиболее эффективного использования растительного сырья. Физические и технологические свойства пектиновых веществ зависят от их молекулярной массы. По величине полученных изотерм следует сделать вывод, что зависимость величины адсорбции от равновесной концентрации ионов свинца в большей степени подчиняется уравнению Ленгмюра.

Introduction. Currently, searching for new sources of raw materials of biologically active substances of plant origin is very important. Unlike synthetic substances, medicinal plants and preparations on their basis possess a wide spectrum of pharmacological action combined with very low toxicity. Pectins are high-molecular compounds of indisputably plant origin, which are recognized as absolutely non-toxic and pharmacologically safe biologically active substances. Pectins are especially effective for the diseases related to lipid and carbohydrate metabolism. Pectic substances are used for treatment the diseases of the gastrointestinal tract, diabetes, atherosclerosis, hemophilia, wounds and burns [1–4].

Practical use of pectins is due to their widespread distribution, relatively easy isolation and high pharmacological activity. Nowadays an intensive study of the relationship between the structure and physico-chemical properties of pectin polysaccharides is being carried out, and the studies of the sorption and complexing pectin properties are also being expanded [5–7].

Sorbaria sorbifolia belongs to the rose family (*Rosaceae* DC). As for its distribution, the following can be noted: the representatives of this family are widely distributed around the globe, but the most diverse are temperate and subtropical belts of the both hemispheres, especially the temperate belt of the Northern Hemisphere. The family covers a wide range of life forms of plants: deciduous and evergreen trees, deciduous and evergreen bushes and shrubs, perennial and annual grasses. Their leaves can be regular, rarely opposite, simple or compound, mostly with stipules. As the object of the study the leaves of *Sorbaria sorbifolia*, harvested in July–August 2016, were used.

The aim of the work was to study rheological properties of aqueous solutions of pectin substances obtained from the leaves of *Sorbaria sorbifolia* (L.).

Materials and methods. Secretion of polysaccharides from the leaves of *Sorbaria sorbifolia* was carried out fraction by fraction on the basis of N.K. Kochetkov and M. Sinner's method: 1st – WSPS (water soluble polysaccharides), 2nd – PS (pectic substances), 3rd – Hz A (hemicellulose A) and 4th – Hz B (hemicellulose B) [1, 8–10] (Fig. 1).

With an Oswald capillary viscometer the average molar mass was determined [10–12]. The time of the water outflow and as well as the outflow of solutions of PS (pectic substances) was measured, the relative viscosity (η) was calculated taking into account the density (ρ_0 , ρ) of solutions (Formula 1):

$$\eta = \frac{t \times \rho}{t_0 \times \rho_0} \quad (1)$$

The average molar mass (Formula 2) was calculated in magnitude to the intrinsic viscosity and Mark-Kuhn-Hauwink's equation:

$$[\eta] = K \times M^\alpha \quad (2)$$

The values of the constants K and α are taken from the literature [1, 2].

On the basis of experimental data, the adsorption capacity of PS from the leaves of *Sorbaria sorbifolia* was estimated [12–14].

The calculation of the experimental value of adsorption was carried out according to Formula 3:

$$A = \frac{x}{m} = \frac{(C_0 - C_{\text{equal}}) \times V}{m}, \quad (3)$$

where x – quantity of adsorbate (mmol);

m – unit mass of the adsorbent (g).

The results are shown in Table 6.

The calculation of the adsorption at the interface “solid-liquid” was carried out according to Freundlich's and Langmuir's equations [13–16].

Here is Freundlich's equation (Formula 4):

$$A = KC\frac{1}{n} \quad (4)$$

To determine the constants K and $\frac{1}{n}$, the following logarithmic relationship is used:

$$\ln A = \ln K + \frac{1}{n} \ln C, \quad (5)$$

where A – experimental of adsorption amount;

C – equilibrium density, mmol/L.

The values of the constants are found according to the graphical dependence $\ln \frac{x}{m} = f(\ln \Delta C)$, presented in Fig. 5.

Langmuir's equation (Formula 6):

$$A = \frac{A_\infty \times C}{b + c}, \quad (6)$$

where A_∞ и b – constants;

C – concentration of adsorbate in a state of adsorption equilibrium, mmol/L.

To determine the constants A_∞ and b , it is more convenient to use the linear form of the equation (Formula 7):

$$\frac{1}{A} = \frac{b}{A_\infty \times c} + \frac{1}{A_\infty} \quad (7)$$

To determine the constants, the graphical dependence $1 / A = f(1 / \Delta C)$ presented in Figure 6 was used.

Results and discussion. While gravimetric analyzing it was found out that in quantity WSPS (water soluble polysaccharides) and PS (pectic substances) predominate. The results are shown in Table 1.

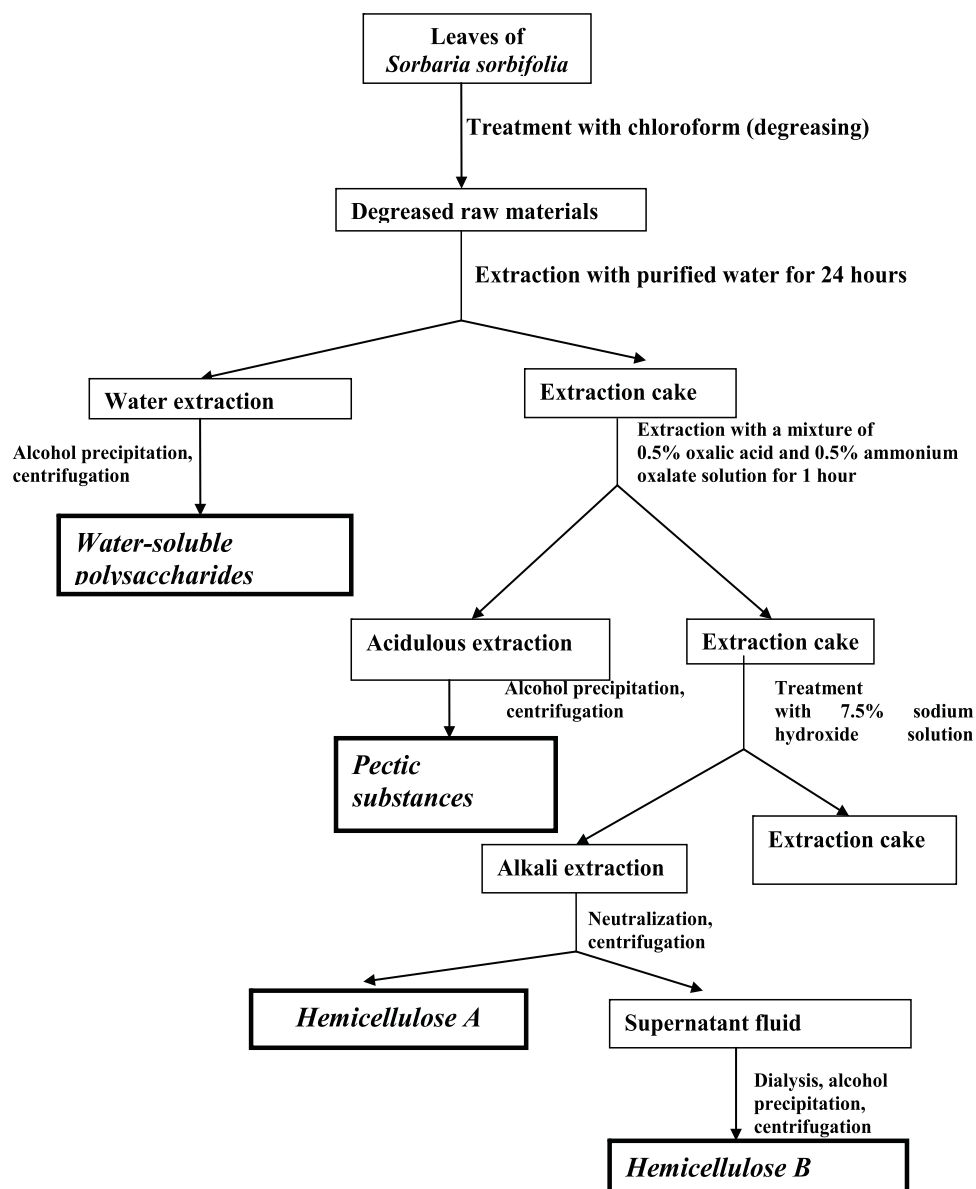


Figure 1 – Scheme for the isolation of polysaccharide complexes from the leaves of *Sorbaria sorbifolia*

Table 1 – Percentage yield of PS and WSPS of *Sorbaria sorbifolia*

Type of raw material, fraction	Leaves of <i>Sorbaria sorbifolia</i>
PS	9.2%
WSPS	1.0%

The structure and properties of high-molar mass species is determined by the average molar mass (M.M.), which has a direct dependence on the method of obtaining this biopolymer. The measurement results are shown in Table 2.

Table 2 – Measurement results of the viscosity of aqueous solutions of PS (pectic substances), obtained from *Sorbaria sorbifolia*

PS from <i>Sorbaria sorbifolia</i>				
C, %	t, sec.	$\eta_{rel.}$	$\eta_{spec. \text{ visc.}}$	$\eta_{given.}$
H ₂ O	12.35			
0.05	14.20	1.15	0.15	3.00
0.10	16.18	1.31	0.31	3.10
0.20	20.30	1.64	0.64	3.20
0.40	29.55	2.39	1.39	3.48
0.80	57.35	4.64	3.64	4.55

Note:

C – concentration of the solution;

t – time;

$\eta_{rel.}$ – relative viscosity;

$\eta_{spec. \text{ visc.}}$ – specific viscosity;

$\eta_{given.}$ – viscosity is given

The relative viscosity, which characterizes the increase in the viscosity of the solution as compared with the viscosity of the solvent, increases with increasing concentration. The polymer molecules begin to interact with each

other and the curve is drawn by convexity to the abscissa axis. Perhaps, the system is being structured [2, 12, 13].

The graphic dependence of η_{rel} on C is presented in Figure 2.

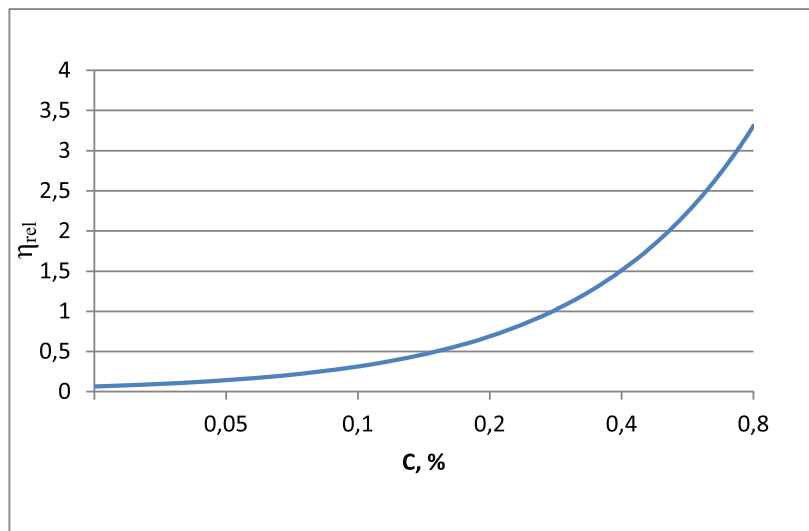


Figure 2 – Dependence of relative viscosity on solutions concentration of PS

The value of the intrinsic viscosity, which reflects the thermodynamic resistance to the flow of biopolymer molecules, was determined by the value of the segment

cut off on the ordinate axis; using the $\eta_{given} = f(C)$ equation the value of $[\eta]$ was determined. The dependence graph is depicted in Figure 3.

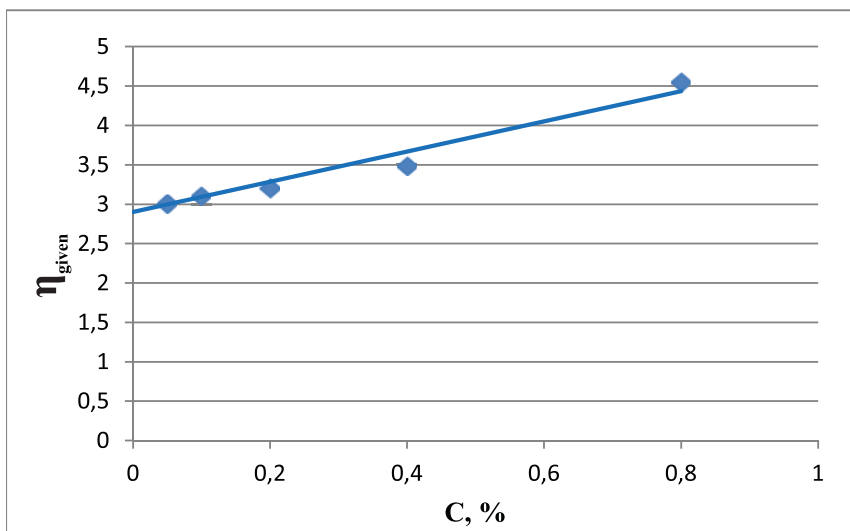


Figure 3 – Dependence of the reduced viscosity on concentration

The average molar mass was calculated using the value of intrinsic viscosity and Mark-Kuhn-Houwink's equation. While calculating this indicator the following

corresponding values from the literature data were used: $K = 1.1 \cdot 10^{-5}$, $\alpha = 1.2$ [1]. The results are presented in Table 3.

Table 3 – Results of molar mass determination

Name of raw material	Intrinsic viscosity	Average molar mass, g/mol
	PS	
Leaves of Sorbaria sorbifolia	2.9	32923

Pectic substances can be attributed to ionic polymers. The degree of dissociation of the polar groups, the magnitude of the charge are related to the pH medium. Macromolecules of water-soluble polyelectrolytes dissociate, splitting simple ions into the solution, and make

up a multiply charged polymer ion. The reaction of the medium determines not only the charge of the ion, but also the conformation of molecules associated with the changing properties of the polyelectrolyte.

Therefore, studying the effect of the pH medium on

the viscosity of PS solutions was attractive. Buffer solutions with pH medium in the range of 3.2-5.7 were prepared. The same volume of 1% pectin-containing solu-

tion was added to them and the time of the liquid outflow was measured with a viscometer. The results are shown in Table 4.

Table 4 – Dependence of the time outflow and viscosity of solutions on the pH medium

No.	pH	t, sec.	$\eta_{rel.}$
1	–	12.96	–
2	3.2	15.17	1.171
3	3.7	15.10	1.165
4	4.2	15.23	1.175
5	4.7	15.02	1.159
6	5.2	14.59	1.126
7	5.7	14.95	1.154

Note:
 t – time;
 $\eta_{rel.}$ – relative viscosity

The graphic dependence of η on the pH medium (Figure 4) shows that at pH = 5.2 a distinct minimum viscosity is observed. In such a medium the PS molecules are electrically neutral and the polyelectrolyte is in the isoelectric state. In this case the molecules are folded into a dense tangle, which ex-

erts less resistance to the flow than a straightened molecule.

At pH below and above 5.2, the viscosity increases as the molecule straightens PS, its volume increases. At pH<5.2 a molecule is positively charged, at pH>5.2 it has a negative charge.

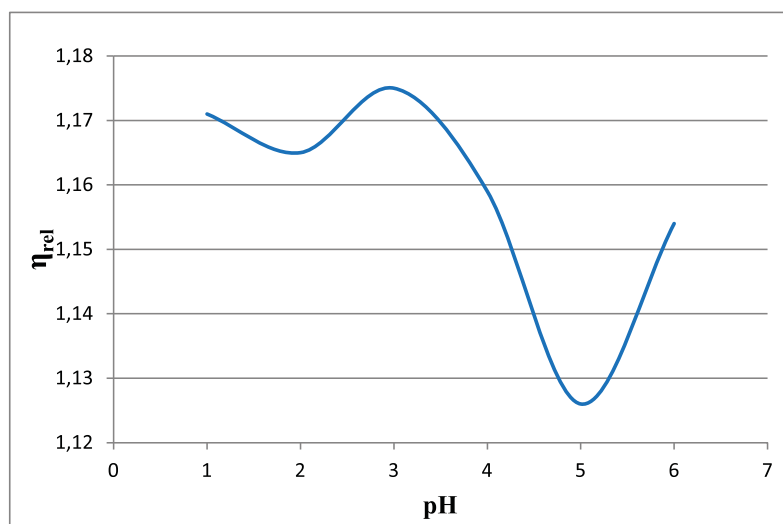


Figure 4 – Dependence of the relative viscosity of a 1% PS solution on the pH medium

It is known that if a polymer is in the isoelectric state, its physico-chemical properties change: electrical conductivity, osmotic pressure, the degree of denaturation and swelling, mechanical strength of jelles, etc. [2, 13, 17]. Therefore, the establishment of the isoelectric point

of the polyelectrolyte will allow to influence the properties of pectin-containing solutions.

The sorption capacity of the obtained pectic substances was studied. Table 5 presents the dependence of the lead ion concentration on the time of the sorption process in contact with the biopolymer under study [18–20].

Table 5 – Changes in the concentration of lead ions in the aqueous phase of PS (pectic substances) solutions from the leaves of Sorbaria sorbifolia

Time, min.	V, ml	Mass content of Pb^{2+} , mg	Mass content of Pb^{2+} , mmol/l	% of binding Pb^{2+} ions	K_1C
0	4.75	98.4	47.5	–	–
10	2.4	49.7	24.0	49.5	324.7
20	2.2	45.6	22.0	53.7	352.0
30	2.1	43.5	21.0	55.8	366.0
40	2.0	41.4	20.0	57.9	380.0
50	1.9	39.4	19.0	60.0	393.3
60	1.9	39.4	19.0	60.0	393.3

Note:
 t – time;
 K_1C – complexing ability

The metal cation and pectin participate in the formation of metal-pectate salts. Using Ostwald's isolation method (Table 6), the change in the concentration of metal ions with a minimal effect of the biopolymer concentration was

taken into account. With respect to this method, this reaction proceeds with an excess amount of polyelectrolyte, in this case of pectin, while the rate of sorption is proportional to the concentration of the metal ion taken in deficiency.

Table 6 – Results of experimental determination of the adsorption magnitude

Time, min.	$C_{Pb^{2+}}$, mmol/l	ΔC , mmol/l	$A_{\text{exper.}}$, mmol/g	$\ln \Delta C$	$\ln A_{\text{exper.}}$	$1/\Delta C$	$1/A_{\text{exper.}}$
PS solutions from the leaves of <i>Sorbaria sorbifolia</i>							
0	47.5	-	-	-	-	-	-
10	24.0	23.5	15.67	3.16	2.75	0.043	0.064
20	22.0	25.5	17.00	3.24	2.83	0.039	0.059
30	21.0	26.5	17.67	3.28	2.87	0.038	0.057
40	20.0	27.5	18.33	3.31	2.91	0.036	0.055
50	19.0	28.5	19.00	3.35	2.94	0.035	0.053

Note:

t – time;

C – equilibrium concentration;

ΔC – concentration difference of the solutions before and after adsorption;

A_E – experimental value of the adsorption

The constant K was found by the value of the segment cut off by a straight line on the ordinate axis. The adsorption index ($\frac{1}{n}$) was determined by the slope of the straight line to the abscissa axis.

The found values of the coefficients of Freundlich's equation for PS from the leaves of *Sorbaria sorbifolia* were: $K = 1.46$; $1/n = 0.9$.

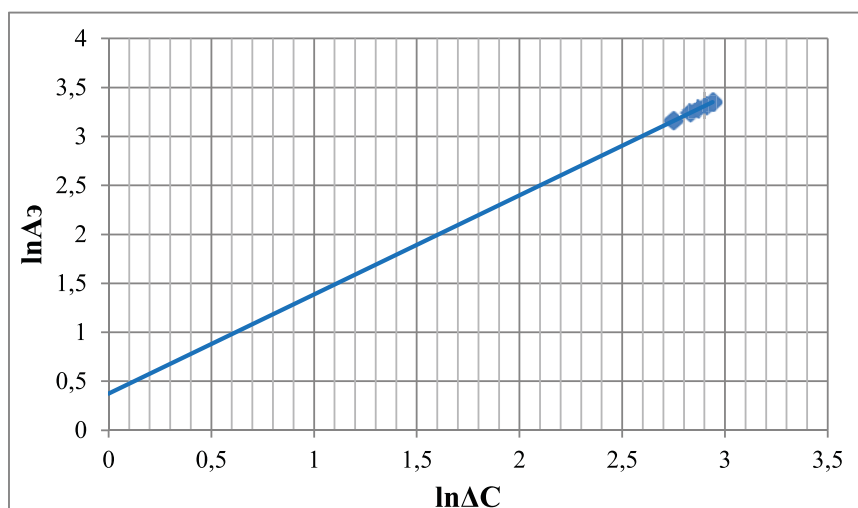


Figure 5 – Graphic determination of the constants of Freundlich's equation for the PS from the leaves of *Sorbaria sorbifolia*

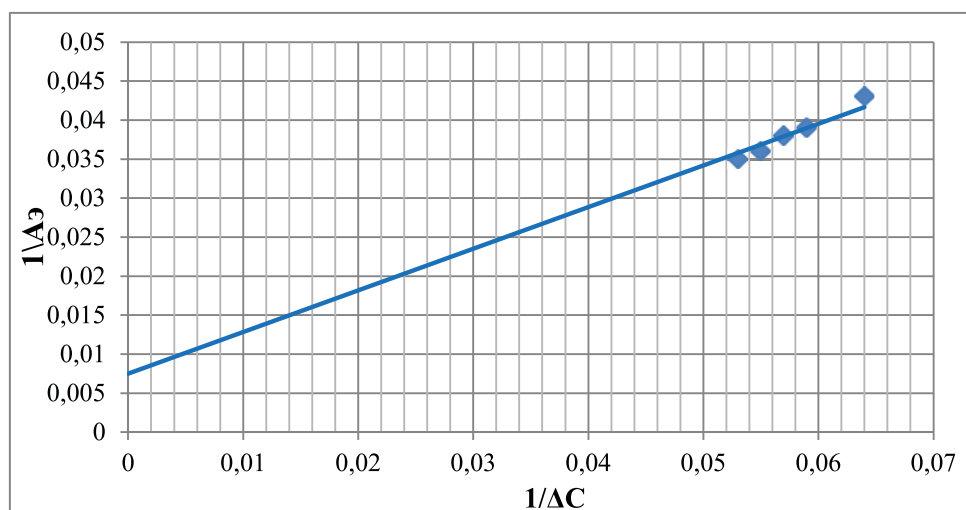


Figure 6 – Graphical determination of the constants of Langmuir's equation for the PS from the leaves of *Sorbaria sorbifolia*

The constant A_{∞} was found by the value of the segment $OD = \frac{1}{A_{\infty}}$. On the basis of the physical meaning of the coefficient (b), that it is equal to the concentration at $\frac{A_{\infty}}{2}$, the segment of OD was doubled and $OM = \frac{1}{b}$ was found.

The found values of the coefficients of Langmuir's equation for the PS from the leaves of *Sorbaria sorbifolia* were: $A_{\infty} = 133$; $b = 167$. Table 7 shows the found adsorption values.

Table 7 – Ratio of experimental adsorption values to the calculated ones

ΔC , mmol/l	$A_{\text{exper.}}$, mmol/g	A_F , mmol/g	A_L , mmol/g	$A_{\text{exper.}}/A_F$	$A_{\text{exper.}}/A_L$
PS from the leaves of <i>Sorbaria sorbifolia</i>					
23.5	15.67	24.93	16.41	0.629	0.955
25.5	17.00	26.84	17.62	0.633	0.965
26.5	17.67	27.78	18.21	0.636	0.970
27.5	18.33	28.73	18.88	0.638	0.971
28.5	19.00	29.66	19.35	0.641	0.982
Average values:				0.64	0.97

Note:

ΔC – concentration difference of the solutions before and after adsorption;

A_e – experimental value of adsorption;

A_F – adsorption according to the Freundlich equation;

A_L – adsorption according to the Langmuir equation

The results showed that the maximal binding of Pb^{2+} ions in *Sorbaria sorbifolia* leaves by pectin within 50 minutes is 60.0%. Expressed as 1 g of sorbent, it respectively equals to 39.4 mg of lead ions.

Conclusion. As a result of the study, the average molar mass is determined as 32923 g/mol. The determination of the average molar mass and the isoelectric point makes

it possible to state the possibility of the most effective use of plant raw materials. Physical and technological properties of pectic substances depend on their molar mass.

The value of the obtained isotherms makes it possible to state that the dependence of the adsorption amount to equilibrium concentration of lead ions is more subject to Langmuir's equation.

Библиографический список

1. Карпович Н.С., Донченко Л.В., Нелина В.В. Пектин. Производство и применение. Киев: Урожай, 1989. 88 с.
2. Шелухина Н.П., Абаева Р.Ш., Аймухамедова Г.Б. Пектин и параметры его получения. Фрунзе: Илим, 1987. 108 с.
3. Криштанова Н.А., Сафонова М.Ю., Болотова В.Ц., Павлова Е.Д. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств // Вестн. ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2005. № 4. С. 181–185.
4. Тверской Л.А., Шалимов С.А., Кейсевич Л.В. Лечебное и лечебно-профилактическое действие пектинов // Врачеб. дело. 1995. № 9–10. С. 10–16.
5. Хотимченко Ю.С., Кропотов А.В., Хотимченко М.Ю. Фармакологические свойства пектинов // Эфферентная терапия. 2001. Т. 7. № 4. С. 2236.
6. Лазарева Е.Б., Меньшиков Д.Д. Опыт и перспективы использования пектинов в лечебной практике // Антибиотики и химиотерапия. 1999. Т. 44. № 2. С. 37–40.
7. Кацева Г.П., Кухта Е.П., Панова З.П. Исследование взаимодействия пектиновых веществ с солями меди, ртути, цинка и кадмия // Химия природ. соединений. 1988. № 2. С. 171–175.
8. Мыкоц Л.П., Богдашев Н.Н., Туховская Н.А. Изучение влияния температуры на свойства пектина из стеблей льна // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. тр. Пятигорск, 2008. Вып. 63. С. 309–310.
9. Никитина В.С., Гайнанова Л.Т., Абдуллин М.И., Беспалова А.А. Пектиновые вещества корней лопуха обыкновенного *Arctium lappa* L. и корней одуванчика лекарственного *Taraxacum officinale* Wigg. // Химия раст. сырья. 2012. № 2. С. 21–26.
10. Кочетков Н.К., Бочков А.Ф., Дмитриев Б.А., Усов А.И., Чижов О.С., Шибанов В.Н. Химия углеводов. М.: Химия, 1967. 672 с.
11. Селина И.И., Пеливанова С.Л., Андреева О.А., Лигай Л.В., Мыкоц Л.П., Оганесян Э.Т. Физико-химические характеристики пектинов и водорастворимых полисахаридов крыжовника отклоненного (*Grossularia reclinata* (L.) mill.), листьев шелковицы черной (*Morus nigra* L.) и шелковицы белой (*Morus alba* L.) // Вопросы биол. мед. и фармац. химии. 2013. №10. С. 20–25.
12. Государственная фармакопея РФ. 12-е изд. М.: Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2007. (Часть 1). 704 с.
13. Шукин Е.Д., Перцов А.В., Амелина Е.А. Коллоидная химия. М.: Высш. шк., 2006. 444 с.
14. Аджаихметова С.Л., Селина И.И., Лигай Л.В., Мыкоц Л.П., Оганесян Э.Т., Туховская Н.А. Исследование сорбционной способности пектинов и водорастворимых полисахаридов крыжовника отклоненного

- (*Grossularia reclinata* (L.) Mill.), листьев шелковицы черной (*Morus nigra* L.) и шелковицы белой (*Morus alba* L.) // Науч. ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2013. №22 (141). С. 170–173.
15. Мыкоц Л.П., Туховская Н.А., Бондарь С.Н. Определение кинетики сорбции катиона металла пектином из цитрусовых // Успехи современного естествознания. 2010. № 6. С. 55–57.
 16. Мыкоц Л.П., Романцова Н.А., Гущина А.В. Изучение сорбционной способности пектина, выделенного из плодов калины обыкновенной, по отношению к ионам свинца // Фундаментальные исследования. 2013. № 3–1. С. 197–200.
 17. Василенко Ю.К., Москаленко С.В., Кайшева Н.Ш. Получение и изучение физико-химических и гепато-протекторных свойств пектиновых веществ // Хим.- фармац. журн. 1997. Т.31. № 6. С. 28–29.
 18. Комиссаренко С.Н., Спиридонов В.Н. Пектины – их свойства и применение // Раст. ресурсы. 1998. Т. 34. Вып. 1. С. 111–119.
 19. Оводов Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах // Биоорганич. химия. 2009. Т.5. № 3. С. 293–310.
 20. Компанцев В.А. Определение комплексообразующей способности пектинов и пектинсодержащих препаратов // Охрана окружающей среды. 1991. Вып. 3. С. 25–27.

References

1. Karpovich NS, Donchenko LV, Nelina VV. Pektin. Proizvodstvo i primeneniye [Pectin. Production and application]. Kiev: Urojay, 1989. 88 p. Russian.
2. Sheluhina NP, Abaeva RSh, Aimiymedova GB. Pektin i parametry ego polucheniya [Pectin and parameters of its preparation]. Frunze: Ilim, 1987. 108 p. Russian.
3. Krishtanova NA, Safonova MU, Bolotova VC, Pavlova ED. Perspektivy ispolzovaniya rastitelnykh polisaharidov v kachestve lechebnykh i lechebno-profilakticheskikh sredstv [Prospects for the use of plant polysaccharides as therapeutic and therapeutic- preventive agents]. Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy. 2005;4:181–5. Russian.
4. Tverskoj LA, Shalimov SA, Keisevich LV. Lechebnoe i lechebno-profilakticheskoe dejstvie pektinov [Therapeutic and therapeutic-preventive effect of pectins]. Vrachebnoe delo. 1995;9–10:10–6. Russian.
5. Hotimchenko US, Kropotov AV, Hotimchenko MU. Farmakologicheskie svoystva pektinov [Pharmacological properties of pectins]. Efferentnaia terapiia. 2001;7(4): 2236. Russian.
6. Lazareva EB, Menshikov DD. Opyt i perspektivy ispolzovaniya pektinov v lechebnoj praktike [Experience and prospects for the use of pectins in medical practice] Antibiotics and chemotherapy. 1999;44(2):37–40. Russian.
7. Kaceva GP, Kuhta EP, Panova ZP. Issledovanie vzaimodeystviya pektinovykh veshchestv s solyami medi rtuti cinka i kadmiya [Study of the interaction of pectin with salts of Copper, Mercury, Zinc and Cadmium]. Chemistry of natural compound. 1988;2:171–5. Russian.
8. Mikoz LP, Bogdashev NN, Tuchovskaya NA. Izuchenie vliyaniya temperatury na svoystva pektina iz stebel ln [Study of the effect of temperature on the properties of pectin from flax stems]. Razrabotka, issledovanie i marketing novoy farmacevticheskoy produkci: sbornik nauchnykh trudov. Pyatigorsk, 2008;63:309–10. Russian.
9. Nikitina VS, Gainanova LT, Abdullin MI, Bepalova AA. Pektinovye veshchestva kornej lopuha obyknovennogo *Arctium lappa* L i kornej oduvanchika lekarstvennogo *Taraxacum officiale* Wigg [Pectic substances of the roots of *Arctium lappa* L. and the roots of *Taraxacum officiale* Wigg.]. Chemistry of plant raw material. 2012;2:21–6. Russian.
10. Kochetkov NK, Bochkov AF, Dmitriev BA, Usov AI, Chijov OS, Shibaev VN. Himiya uglevodov [Chemistry of carbohydrates]. Moscow: Himiya, 1967. 672 p. Russian.
11. Selina II, Pelivanova SL, Andreeva OA, Ligai LV, Mikoz LP, Oganesyan ET. Fiziko-himicheskie harakteristiki pektinov i vodorastvorimyyh polisaharidov kryzhovnika otklonennogo *Grossularia reclinata* L mill listev shelkovicy chernoj (*Morus nigra* L.) i shelkovicy belo (*Morus alba* L.) [Physicochemical characteristics of pectins and water-soluble polysaccharides of *Grossularia reclinata*, *Morus nigra* and *Morus alba*]. Voprosy biologicheskoy medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2013;10:20–5. Russian.
12. Gosudarstvennaya farmakopeya RF [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. 12 ed. Moscow: Nauchnyj centr ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya, 2007(Pt.1) 704 p. Russian.
13. Shukin ED, Perzov AV, Amelina EA. Kolloidnaya himiya [Colloid chemistry]. Moscow: Vishaya shkola, 2006. 444 p. Russian.
14. Adjiachmetova SL, Selina II, Ligai LV, Mikoz LP, Oganesyan ET, Tuhovskaya NA. Issledovanie sorbcionnoj sposobnosti pektinov i vodorastvorimyyh polisaharidov kryzhovnika otklonennogo *Grossularia reclinata* (L.) Mill listev shelkovicy chernoj *Morus nigra* L i shelkovicy belo (*Morus alba* (L.)) [Study of the sorption ability of pectins and water-soluble polysaccharides of *Grossularia reclinata* (L.) Mill., leaves of mulberry black *Morus nigra* L. and mulberry white (*Morus alba* L.)]. Belgorod State University Scientific bulletin. 2013;22(141):170–3. Russian.
15. Mikoz LP, Tuhovskaya NA, Bondar SN. Opredelenie kinetiki sorbcii kationa metalla pektinom iz citrusovykh [Determination of the kinetics of metal cation sorption by citrus pectin]. Advances in current natural sciences. 2010;6:55–7. Russian.

16. Mikoz LP, Romantzova NA, Gushina AB. Izuchenie sorbcionnoj sposobnosti pektina vydelennoho iz plodov kalinyy obychnovennoy po otnosheniyu k ionam svinca [Study of sorption ability of the pectin extracted from the fruit of viburnum ordinary, in relation to ions of lead]. Fundamental research. 2013; № 3-1:197–200. Russian.
17. Vasilenko UK, Moskalenko SV, Kaisheva NSH. Poluchenie i izuchenie fiziko-himicheskikh i gepatoprotekturnykh svoystv pektinovykh veshchestv [Obtaining and study of physico-chemical and hepatoprotective properties of pectin]. Pharmaceutical Chemistry Journal. 1997;31(6):28–9. Russian.
18. Komissarenko SN, Spiridonov VN. Pektiny – ih svoystva i primeneniye [Pectins – their properties and applications]. Rastitelnye Resursy. 1998;34(1):111–9. Russian.
19. Ovodov US. Sovremennyye predstavleniya o pektinovykh veshchestvakh [Modern views on pectin substances]. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2009;5(3):293–310. Russian.
20. Kompantsev VA. Opredeleniye kompleksobrazuyushchei sposobnosti pektinov i pektinsoderzhashchikh preparatov [Determination of the complexing ability of pectins and pectin-containing preparations]. Ochrana okruzhayushchei sredy. 1991;3:25–7. Russian.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы:

Аджиахметова Сими́лла Леонтьевна – преподаватель кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: химия природных соединений. E-mail: similla503@mail.ru

Мы́коц Лили́я Петро́вна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры неорганической, физической и коллоидной химии, Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: физико-химические свойства природных соединений. E-mail: 58041@mail.ru

Черво́нная Наде́жда Миха́йловна – аспирант кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: химия природных соединений. E-mail: nadezhda.chervonnaya@yandex.ru

Харче́нко Ири́на Ива́новна – аспирант кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: химия природных соединений. E-mail: irinselina@yandex.ru

Тухо́вская Ни́на Алекса́ндровна – кандидат химических наук, преподаватель кафедры аналитической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: сорбционная способность природных соединений. E-mail: ninatuk@mail.ru

Ога́несян Эдуа́рд Тони́кович – доктор фармацевтических наук, профессор, зав. кафедрой органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: химия природных соединений и их синтетических аналогов; исследование промышленных отходов пищевого и фармацевтического производства как дополнительного источника получения лечебно-профилактических средств, медицинская химия. E-mail: edwardov@mail.ru

Авторы:

Adjiahmetova Similla Leontevna – Teacher of the Department of Organic Chemistry, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University. Research interests: chemistry of natural compounds. E-mail: similla503@mail.ru

Myikots Liliya Petrovna – Candidate of Sciences (Pharmacy), Associate Professor of the Department of Inorganic, Physical and Colloid Chemistry, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University. Research interests: physical and chemical properties of natural compounds. E-mail: 58041@mail.ru

Chervonnaya Nadejda Mihaylovna – post-graduate student of the Department of Organic Chemistry Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University. Research interests: chemistry of natural compounds. E-mail: nadezhda.chervonnaya@yandex.ru

Harchenko Irina Ivanovna – post-graduate student of the Department of Organic Chemistry Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University. Research interests: sorption ability of natural compounds. E-mail: irinselina@yandex.ru

Tuhovskaya Nina Aleksandrovna – Candidate of Sciences (Chemistry), teacher of the Department of Analytical Chemistry Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University. Research interests: sorption ability of natural compounds. E-mail: ninatuk@mail.ru

Oganesyan Eduard Tonikovich – Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor, Head of the Department of Organic Chemistry Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University. Research interests: chemistry of natural compounds and their synthetic analogues; research of industrial wastes of food and pharmaceutical production as an additional source of medical and prophylactic drugs, medical chemistry. E-mail: edwardov@mail.ru

Поступила в редакцию: 31.05.2017
Отправлена на доработку: 20.06.2017
Принята к печати: 30.08.2017

Received: 31.05.2017
Sent back for revision: 20.06.2017
Accepted for publication: 30.08.2017

УДК: 615.211/.212.4:611.72:616.72-002.77

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И КОМПЬЮТЕРНОЕ ТОМОГРАФИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИБУПРОФЕНА И ЕГО КОМБИНАЦИИ
С 2-ФЕНИЛ-3-КАРБЕТОКСИ-4-ДИМЕТИЛАМИНО-
МЕТИЛ-5-ОКСИБЕНЗОФУРАНА ГИДРОХЛОРИДОМ (ВИНБОРОНОМ)
НА СОСТОЯНИЕ СУСТАВОВ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ КРЫС
С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ**

Ф.В. Гладких¹, В.Е. Студент^{2,3}, Н.Г. Степанюк², С.В. Вернигородский⁴

¹Государственное учреждение «Институт медицинской радиологии имени С.П. Григорьева
Национальной академии медицинских наук Украины». 61024, Украина, г. Харьков, ул. Пушкинская, 82

²Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого
Министерства здравоохранения Украины. 79010, Украина, г. Львов, ул. Пекарская, 69

³Центр медицинской 3D диагностики. 79010, Украина, г. Львов, ул. Черниговская, 18

⁴Винницкий национальный медицинский университет имени Н.И. Пирогова
Министерства здравоохранения Украины. 21018, Украина, г. Винница, ул. Пирогова, 56

E-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

E-mail: student.volodymyr@gmail.com

E-mail: 3dlviv@gmail.com

E-mail: medservit@gmail.com

Наиболее частыми нежелательными реакциями при использовании нестероидных противовоспалительных препаратов являются поражения верхних и нижних отделов желудочно-кишечного тракта, гепатотоксичность, нефротоксичность, снижение синтеза протеогликанов хрящевой ткани, а также аллергические реакции. В предыдущих исследованиях нами было установлено, что спазмолитик украинского производства с политропными фармакологическими эффектами винборон способен улучшить профиль безопасности популярного нестероидного антифлогистика ибупрофена, а также способен потенцировать его противовоспалительное действие, что стало предпосылкой детального исследования механизмов терапевтического действия указанных препаратов при их совместном применении. **Цель исследования.** Охарактеризовать влияние винборона (11 мг/кг, в/ж) на противовоспалительную активность ибупрофена (218 мг/кг, в/ж) при их комбинированном применении на модели экспериментального ревматоидного артрита по данным патоморфологического, морфометрического и конусно-лучевого компьютерного томографического исследований суставов нижних конечностей у крыс. **Материалы и методы.** Для воспроизведения условий введения ибупрофена, соответствующих его клиническому применению, нами была выбрана модель экспериментального ревматоидного артрита – адьювантный артрит (АА) у крыс. На 28 день животных выводили из эксперимента, после чего выполняли ампутацию задних конечностей на уровне тазобедренных суставов (art. coxae) с последующей фиксацией материала в 10,0 % водном растворе нейтрального формалина. Голеностопные суставы подвергали декальцинации. Препараты готовили по стандартной методике. Микроскопию и фотография гистологических препаратов проводили с помощью светового микроскопа OLIMPUS BX 41 при увеличениях в 40, 100, 200 и 400 раз. Получали и обрабатывали снимки, проводили морфометрию с помощью программы «Quick PHOTO MICRO 2.3». Содержание клеточных элементов определяли из расчета на единицу условной площади (1 мм²). Конусно-лучевая компьютерная томография проводилась с помощью цифрового

Для цитирования:

Гладких Ф.В., Студент В.Е.,
Степанюк Н.Г., Вернигородский С.В.
ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И КОМПЬЮТЕРНОЕ
ТОМОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ
ИБУПРОФЕНА И ЕГО КОМБИНАЦИИ
С 2-ФЕНИЛ-3-КАРБЕТОКСИ-4-ДИМЕТИЛАМИНО-
МЕТИЛ-5-ОКСИБЕНЗОФУРАНА ГИДРОХЛОРИДОМ
(ВИНБОРОНОМ) НА СОСТОЯНИЕ СУСТАВОВ
НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕН-
ТАЛЬНЫМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ.
Фармация и фармакология. 2017;5(5):457-486.
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-457-486

© Гладких Ф.В., Студент В.Е.,
Степанюк Н.Г., Вернигородский С.В., 2017.

For citation:

Hladkykh F.V., Student V.O.,
Stepaniuk N.H., Vernyhorodskiy S.V.
PATHOMORPHOLOGICAL AND computerized TOMOG-
RAPHY STUDY OF IBUPROFEN AND COMBINATION
WITH 2-PHENYL-3-CARBETHOXY-4-DIMETHYLAMI-
NOMETHYL-5-OXSIBENZOFURANA HYDROCHLO-
RIDE (VINBORON) INFLUENCE ON THE JOINTS OF
LOWER EXTREMITIES OF RATS WITH EXPERIMEN-
TAL RHEUMATOID ARTHRITIS
Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(5):457-486. (In Russ.)
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-457-486

панорамного конусно-лучевого томографа «Point 3D Combi 500» (PointNix, Южная Корея), с использованием плоскостного сенсора с участком сканирования 9×12 мм и лучевой нагрузкой 30–100 мкЗв. Сканирование проводили с напряжением 52,0 кВ и силой тока 6,0 мА. Для интегральной характеристики линейных размеров суставов задних конечностей крыс нами была предложена формула расчета объема сустава (Патент Украины № UA 117538). **Результаты и обсуждение.** Применение ибупрофена в комбинации с винбороном сопровождалось восстановлением структуры и функции хрящевой и костной ткани, о чем свидетельствовало появление кислых и сульфатированных гликозаминогликанов. Восстановление костной ткани реализовалось путем разрастания соединительной ткани и трансформации ее в хрящ. Синовиальная оболочка была гиперплазированной с пролиферирующими синовиоцитами как макрофагального, так и секреторного типов. В редких случаях сохранялись явления умеренного отека и незначительная очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация. Таким образом, применение ибупрофена и винборона в комбинации с винбороном у крыс с АА приводило к уменьшению или отсутствию воспаления как в суставе, так и в периартикулярных тканях. Анализ результатов конусно-лучевой компьютерной томографии и цифровой рентгенографии показал, что на фоне одновременного введения ибупрофена и винборона отмечается тенденция к усилению противовоспалительного действия исследуемого антифлогистика на пораженные адъювантным артритом суставы крыс. На это указывало уменьшение на 28 сутки эксперимента объема суставов задних конечностей в среднем на 33,8 % относительно показателей контрольных животных и практически полное восстановление ширины суставных щелей исследуемых суставов. Также установлено, что винборон способен гармонизировать противовоспалительное действие ибупрофена при их совместном применении. **Заключение.** Применение винборона в комбинации с ибупрофеном приводит к более выраженному патогенетическому противовоспалительному структурно-модифицирующему действию указанного антифлогистика.

Ключевые слова: нестероидные противовоспалительные препараты, ибупрофен, винборон, суставы, артрит, конусно-лучевая компьютерная томография, морфометрия

PATHOMORPHOLOGICAL AND COMPUTERIZED TOMOGRAPHY STUDY OF IBUPROFEN AND COMBINATION WITH 2-PHENYL-3-CARBETHOXY-4-DIMETHYLAMINOMETHYL-5-OXSIBENZOFURAN HYDROCHLORIDE (VINBORON) INFLUENCE ON THE JOINTS OF LOWER EXTREMITIES OF RATS WITH EXPERIMENTAL RHEUMATOID ARTHRITIS

F.V. Hladkykh¹, V.O. Student^{2,3}, N.H. Stepaniuk², S.V. Vernyhorodskyi⁴

¹ State institution «Grigoriev Institute for Medical Radiology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine». 82, Pushkinska Str., Kharkiv, Ukraine, 61024

² Danylo Halytsky Lviv National Medical University. 69, Pekarska Str., Lviv, Ukraine, 79010,

³ Center for Medical 3D Diagnostics. 18, Chernihivska Str., Lviv, Ukraine, 79010

⁴ Vinnitsa National Pirogov Memorial Medical University. 56, Pirogova Str., Vinnitsa, Ukraine, 21018,

E-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

E-mail: student.volodymyr@gmail.com

E-mail: 3dlviv@gmail.com

E-mail: medservervit@gmail.com

The most frequent adverse reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs are upper and lower gastrointestinal tract disorders, hepatotoxicity, nephrotoxicity, a decrease in the synthesis of proteoglycans of the cartilaginous tissue and allergic reactions. In our previous studies we have found out that Ukrainian vinboron, the antispasmodic with polytrophic pharmacological effects, can improve the safety profile of the popular non-steroidal antiphlogistics ibuprofen and can also potentiate its anti-inflammatory effect. That fact has become the background to a detailed study of the therapeutic action mechanisms of these drugs when they are used together. **Aim of the study.** To characterize the influence of vinboron (11 mg/kg, i.g.) on the anti-inflammatory activity of ibuprofen (218 mg/kg, i.g.) when combined, in a model of experimental rheumatoid arthritis according to pathomorphological, morphometric and cone-ray computerized tomography of rats' hind limbs. **Materials and methods.** To reproduce the conditions for the administration of ibuprofen corresponding to its clinical use, we selected a model of experimental rheumatoid arthritis-adjuvant arthritis (AA) in rats. On the 28th day the animals were excluded from the experiment. It was followed by the amputation of the hind limbs at the level of the hocks (art. coxae) and fixation of the material in 10.0% aqueous solution of neutral formalin. The ankle joints were decalcified. The drugs were prepared according to the standard procedure. Microscopy and photographing of histological preparations were carried out with the light microscope OLIMPUS BX 41 at magnifications of 40, 100, 200 and 400 times. The obtained images were processed and

morphometry was carried out with the program "Quick PHOTO MICRO 2.3". The contents of the cellular elements was determined on the basis of the equivalent unit area (1 mm²). Cone-ray computerized tomography was carried out with a digital panoramic cone-ray tomographic scanner—"Point 3D Combi 500" (PointNix, South Korea), using a planar sensor with a scanning site of 9 × 12 mm and a radial load of 30-100 μSv. Scanning was carried out with a voltage of 52.0 kV and the electric current of 6.0 mA. For the integral characteristics of the linear dimensions of rats' hind limbs joints we proposed a formula for calculating the joint volume (Patent of Ukraine No. UA 117538). For the integral characteristics of the dimensions of rats' hind limbs linear joints we proposed a formula for calculating the joint volume (Patent of Ukraine No. UA 117538). **Results and discussion.** The use of ibuprofen in combination with vinboron was accompanied by restoration of the structure and function of the cartilage and bone tissues, evidenced by the appearance of acidic and sulfated glycosaminoglycans. The restoration of the bone tissue was realized by the proliferation of the connective tissue and its transformation into cartilage. The synovial membrane was hyperplastic with proliferating synoviocytes of both macrophage and secretory types. In rare cases, the phenomenon of moderate edema and minor focal lymphohistiocytic infiltration persisted. Thus, the use of ibuprofen and vinboron in combination with vinboron in rats with adjuvant arthritis resulted in a reduction or absence of inflammation in both the joint and periarticular tissues. The analysis of the results of cone-ray computerized tomography and digital radiography showed that against the background of simultaneous administration of ibuprofen and vinboron there was a tendency to increase the anti-inflammatory effect of the studied antiphlogistics on the rats' joints affected by adjuvant arthritis. On the 28-th day of the experiment there was the indication of decrease of the volume of the hind limb joints by an average of 33.8% compared to the control animals and a near-complete restoration of the width of the joint gaps of the joints examined. It was also determined that vinboron can harmonize the anti-inflammatory effect of ibuprofen when they are used together. **Conclusion.** The use of vinboron in combination with ibuprofen leads to a more pronounced pathogenetic anti-inflammatory structural-modifying effect of this antiphlogistics.

Keywords: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, ibuprofen, vinboron, joints, arthritis, cone-beam computerized tomography, morphometry

Введение. Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) – основной класс лекарственных средств, используемых в ревматологии. Подавление воспаления является одной из основных задач патогенетической терапии ревматических заболеваний, поскольку именно с хронической воспалительной реакцией связано прогрессирование необратимых структурных изменений суставов [1, 2]. В противовоспалительном эффекте НПВП важное значение отводят блокаде циклооксигеназы, снижению синтеза простагландинов, антибрадикининовому действию, уменьшению проницаемости сосудистой стенки. НПВП тормозят свободнорадикальные реакции, стабилизируют лизосомные мембраны, препятствуя выходу лизосомальных ферментов, предотвращают активацию иммунокомпетентных клеток на ранних этапах воспаления, снижают энергетический обмен, деление фибробластов и синтез коллагена, уменьшают выраженность гиперергического воспаления, гиперемии, отек, боль, степень деструкции тканей [1, 2].

Однако достижение структурно-модифицирующего действия НПВП при ревматических заболеваниях – подавления эктопической оссификации посредством торможения активации остеокластов, неоангиогенеза и усиления клеточного апоптоза, возможно лишь при их назначении в субмаксимальных / максимальных терапевтических дозах и на длительный срок, поскольку аутоиммунное воспаление имеет самоподдерживающийся, циклический характер. В этой ситуации риск развития класс-специфических осложнений может стать основным фактором, ограничивающим терапевтический потенциал этих препаратов [1–4].

К сожалению, нежелательные реакции при приеме НПВП относятся к реакциям типа А – частые, предсказуемые побочные действия, являющиеся следствием известного фармакологического механизма, и могут наблюдаться у любого пациента. Наиболее частыми нежелательными реакциями при использовании НПВП являются гастро- и энтеротоксичность, гепатотоксичность, нефротоксичность, тромботические осложнения, снижение синтеза протеогликанов хрящевой ткани, а также аллергические реакции [3–11].

Ранее нами было установлено, что спазмолитик украинского производства с политропными фармакологическими эффектами винборон способен улучшать профиль безопасности популярного нестероидного антифлогистика ибупрофена, а также способен потенцировать его противовоспалительное действие, что стало предпосылкой детального исследования механизмов терапевтического действия указанных препаратов при их совместном применении [12–16].

Цель исследования. Охарактеризовать влияние винборона (11 мг/кг, в/ж) на противовоспалительную активность ибупрофена (218 мг/кг, в/ж) при их комбинированном применении на модели экспериментального ревматоидного артрита по данным патоморфологического, морфометрического и конусно-лучевого компьютерного томографического исследований суставов нижних конечностей у крыс.

Материалы и методы. Исследование проведено на 28 половозрелых крысах-самцах, разбитых на 4 группы: I – интактные крысы (n=7), II – крысы со смоделированным адьювантным артритом (АА) без лечения (контроль), III – крысы с АА (n=7), леченные ибупрофеном (218 мг/кг, внутривенно), IV – кры-

сы с АА (n=7), леченные ибупрофеном (218 мг/кг, внутривенно) в комбинации с винборном (11 мг/кг, внутривенно). Для воспроизведения условий введения ибупрофена, соответствующих его клиническому применению нами была выбрана модель экспериментального ревматоидного артрита (РА) – адьювантный артрит (другое название – артрит Пирсона (Pearson С.М. и соавт., 1959 г.)) у крыс, который имеет все морфофункциональные признаки РА и сопровождается типичной реакцией, основным звеном которой является Т-клеточный иммунитет [17]. АА моделировали путем субплантарного введения полного адьюванта Фрейнда (complete Freund's adjuvant – CFA (*Thermo scientific, США*), 100 мкл / крысу), который содержит полисахариды убитой нагреванием палочки Коха (*Mycobacterium tuberculosis – Mtb*, 5 мг/мл) и сложные жирные кислоты (derivаты ланолина) с эмульгатором (вазелиновое масло) в соотношении 1:2 в правую заднюю конечность крыс [18–23]. День введения адьюванта считали как «0» день эксперимента.

Лечение АА проводилось с 14 по 28 день, путем внутривенного введения исследуемых препаратов. Начало введения лекарственных средств отвечало максимальной воспалительной реакции [18–19]. Ибупрофен (ЗАО «Фармацевтическая фирма «Дарница», Украина) вводили внутривенно в виде суспензии на основе эмульгатора полиоксиэтилен (20) сорбитан моноолеата (другие названия: Твин-80 (Tween 80), полисорбат-80 (Polysorbat-80), E433) и воды *pro injectionibus* (ОАО «Галичфарм», Украина). винборон (ПАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ», Украина), растворенный в воде *pro injectionibus* (ОАО «Галичфарм», Украина), вводился за 60 мин до введения ибупрофена, дважды в сутки.

Для экстраполяции среднетерапевтических доз для человека на изотактивные дозы для крыс нами произведен перерасчет по методу Рыболовлева Ю.Р. и соавт. (1979 г.) [24]. Доза ибупрофена (ЗАО «Фармацевтическая фирма «Дарница», Украина) для человека 2400 мг (по 0,8 г 3 р/д), которая обладает достаточной противовоспалительной активностью и рекомендуется для лечения РА [1–2, 25], при пересчете соответствует изотактивной дозе для крыс 218 мг/кг. Доза винборона (ПАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ», Украина) для человека 120 мг (по 0,04 г 3 р/д), которая рекомендована к применению в лечении больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки соответствует дозе для крыс 11 мг/кг [26–28].

Эвтаназию животных проводили на 28 сутки эксперимента путем цервикальной дислокации под ингаляционным трихлорметановым (CHCl_3) наркозом после чего выполняли ампутацию задних конечностей на уровне тазобедренных суставов (*art. coxae*) с последующей фиксацией материала в 10,0 % водном растворе нейтрального формалина. Голеностопные суставы подвергали декальцинации. Препараты готовили по стандартной методике, гистологические срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону, основным коричневым за Шубичем, комбинацией ос-

новного коричневого и крепкого зеленого красителя, ШИК-реакции с ализариновым синим [29–33].

Микроскопию и фотографирование гистологических препаратов проводили с помощью светового микроскопа OLIMPUS BX 41 при увеличениях в 40, 100, 200 и 400 раз. Получали и обрабатывали снимки, проводили морфометрию с помощью программы «Quick PHOTO MICRO 2.3». Содержание клеточных элементов определяли из расчета на единицу условной площади (1 мм²). При выполнении морфометрических исследований руководствовались основными принципами, изложенными в руководстве Автандилова Г. Г. (2002) [29].

По данным Aurell Y. и соавт. (2014) [34] в диагностике РА информативным методом инструментальной диагностики является компьютерная томография. Беря во внимание малые размеры исследуемого материала, нами была выполнена конусно-лучевая компьютерная томография (КЛКТ). Исследование проведено на базе Центра медицинской 3D диагностики (г. Львов, Украина) с помощью цифрового панорамного конусно-лучевого томографа «Point 3D Combi 500» (PointNix, Южная Корея), с использованием плоскостного сенсора с участком сканирования 9×12 мм и лучевой нагрузкой 30–100 мкЗв [35–38]. Сканирование проводили с напряжением 52,0 kV и силой тока 6,0 mA, которые были определены нами эмпирически, как оптимальные для исследования задних конечностей крыс. Мультипланарную реконструкцию (Multi-Planar Reconstruction – MPR) костных структур высокого разрешения осуществляли с помощью программного обеспечения «RealScan».

С помощью программного обеспечения «RealScan – CD Viewer» (PointNix, Южная Корея) проводили измерения ширины и высоты сустава, а также определяли ширину суставной щели (рис. 1).

Измерения исследуемых показателей производили по унифицированным алгоритмам: ширину сустава определяли во фронтальной плоскости с предварительной настройкой векторных линий параллельно продольным осям костных структур участка исследования и увеличением толщины отображения среза до 2 мм. Измерение высоты сустава было проведено по его средней части в сагиттальной плоскости с предварительной настройкой сагиттального вектора параллельно продольной оси проксимальной трубчатой кости, с дополнительным увеличением толщины отображения среза до 2 мм. Ширину суставных щелей измеряли между замыкающими пластинками суставных поверхностей во фронтальной (реже – сагиттальной) плоскости с предварительной настройкой векторных линий по вышеуказанной методике. Предложенный алгоритм позволял минимизировать явления пространственного наложения анатомических структур.

Для интегральной характеристики линейных размеров суставов задних конечностей крыс нами была предложена формула расчета объема сустава (Патент Украины № UA 117538) [39]. Условно был избран цилиндр, как ближайшая фигура соответствующей пространственной организации мелких суставов (рис. 2).



Рисунок 1 – Конусно-лучевая томограмма стопы крысы в окне программы «RealScan – CD Viewer»

Оценку эффективности противовоспалительной терапии проводили путем сравнения рассчитанных по полученным линейным размерам объемов десяти суставов (I – V плюснефаланговых и проксимальных межфаланговых суставов I – V пальцев стопы), ширины и высоты костных рядов запястья и плюсны, а также ширины суставных щелей десяти суставов (I – V плюснефаланговых и проксимальных межфаланговых суставов I – V пальцев стопы) при различных условиях эксперимента и сравнении ширины суставной щели в соответствующих суставах. Полученные расхождения выражали в % по отношению к показателям интактных животных и животных с АА без лечения.

За высоту цилиндра принимали высоту сустава. Радиус цилиндра рассчитывали как половину ширины сустава, которую измеряли во фронтальной плоскости ($R = \frac{1}{2}$ ширины сустава, мм). Объем рассчитывали по формуле $V = \pi \times R^2 \times h$, где V – объем сустава (мм^3), π – математическая константа, отражающая от-

ношение длины окружности к ее диаметру и составляет 3,14; R – радиус окружности в основе цилиндра ($\frac{1}{2}$ ширины сустава, мм) h – высота цилиндра (высота сустава в сагиттальной плоскости, мм) [39].

Все экспериментальные исследования над лабораторными животными проводили в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики (GLP) и с соблюдением основных положений Конвенции Совета Европы об охране позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях от 18 марта 1986 г., Директивы Европейского парламента и Совета ЕС 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей; приказ МЗ Украины от 14 декабря 2009 г. №944 «Об утверждении порядка проведения доклинического изучения лекарственных средств и экспертизы материалов доклинического изучения лекарственных средств» и Закона Украины от 21 февраля 2006 г. №3447-IV «О защите животных от жестокого обращения» [40].

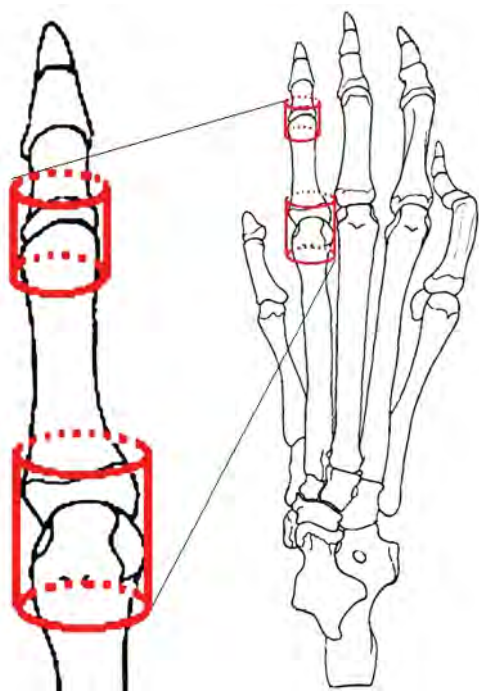


Рисунок 2 – Оценка объема мелких суставов с помощью геометрического моделирования на примере плюснефалангового и проксимального межфалангового суставов второго пальца задней правой конечности крысы

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием прикладной программы для работы с электронными таблицами «Microsoft Office Excel 2003; 2013» (Microsoft Corporation, США) с помощью расширения «Real Statistics» в среде Windows XP Professional (Microsoft Corporation, США). Оценку характера распределения величин в каждой группе выборочной совокупности проводили с использованием W-критерия Шапиро-Вилка (Shapiro-Wilk test, $n < 50$). Однородность дисперсий определяли по критерию Левена (Levene's test). Для оценки значимости выявленных различий исследуемых показателей при разных условиях эксперимента проводили статистический анализ с использованием параметрических и непараметрических критериев. Поскольку все исследуемые величины подчинялись закону нормального распределения (распределение Гаусса-Лапласа), достоверность различий между ними определяли попарно по t-критерию Стьюдента. Полученные значения сравнивали с критическими при уровне достоверности выше 95,0% ($p \leq 0,05$), выше 99,0% ($p \leq 0,01$), выше 99,5% ($p \leq 0,005$) и выше 99,9% ($p \leq 0,001$) и делали вывод о вероятности погрешности.

При ненормальном распределении, по крайней мере одной из групп независимых величин, различия между ними определяли попарно по непараметрическому ранговому U-критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney).

Для оценки связи между переменными при условии нормального распределения величин проводили

однофакторный корреляционный анализ по Пирсону (Pearson) или ранговый корреляционный анализ по Спирману (Spearman) при ненормальном распределении. По значению абсолютной величины коэффициента Пирсона (r) или коэффициента Спирмана (ρ) характеризовали корреляционную связь по следующим критериям: $r < 0$ – обратная связь; $0 \leq |r| < 0,1$ – связь отсутствует; $0,1 \leq |r| < 0,3$ – слабая; $0,3 \leq |r| < 0,7$ – умеренная; $0,7 \leq |r| < 0,99$ – сильная; $0,99 < |r| \leq 1$ – полная (функциональная) и указывали вероятность ошибки (p) выявленных связей. Характер направления связи определяли в зависимости от знака коэффициента корреляции: прямая связь при положительном знаке (+) и обратная в случае отрицательного знака (–).

Цифровые данные в случае нормального распределения величин приведены в виде « $M \pm m$ » ($M \pm SE$), где M – среднее арифметическое значение, m (SE) – стандартная ошибка среднего арифметического или M (95% доверительный интервал (ДИ): 5%–95%), где 95% ДИ: – 95% доверительный интервал (Confidence interval – CI). При ненормальном распределении полученных величин данные представлены в виде $Me [LQ; UQ]$, где Me – медиана [LQ; UQ] – верхняя граница нижнего (первого) квартиля (lower quartile – LQ) и нижняя граница верхнего (третьего) квартиля (upper quartile – UQ).

Для графического представления данных выбрали диаграммы размаха (box-and-whiskers diagram – «ящик» диаграммы с «усами»), на которых отображались максимальное и минимальное значение в случае ненормального распределения величин или границы 95% доверительного интервала при нормальном распределении, интерквартильный размах (Interquartile range – IQR) в виде бокса от 25-го до 75-го перцентилей при ненормальном распределении величин или границы стандартной погрешности среднего арифметического при нормальном распределении величин, медиану и/или среднее арифметическое значение [41].

Результаты и обсуждение. На 28 день эксперимента патоморфологическое исследование синовиальной оболочки (СО) голеностопных суставов экспериментальных животных с АА без лечения показало преобладание хронического продуктивного воспаления со значительным пролиферативным компонентом и дегенеративно-дистрофическими изменениями хряща и волокнистой соединительной ткани, окружающей синовиальный хрящ.

Суставная поверхность теряла свои границы, часто была с неровными контурами, имела различной глубины дефекты, которые наблюдались у 60,0% животных с нелеченым АА. Почти во всех исследованных препаратах хрящей животных контрольной группы животных обнаружены признаки формирования паннуса, который иногда полностью инвазировал хрящ, замещая его соединительной тканью (рис. 3). В периапартулярных тканях, наряду с их отеком, отмечалась массивная клеточная инфильтрация, преимущественно лимфоидная со скоплением плазматических, гигантских многоядерных клеток, формирующая гранулемы, которые были окружены коллагеновыми волокнами.

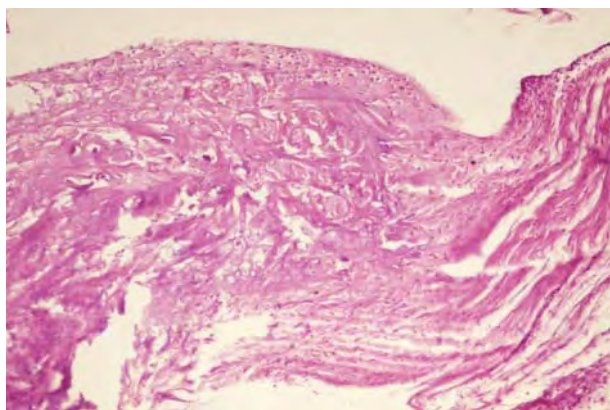


Рисунок 3 – Дегенеративные изменения хряща с формированием паннуса.

АА без лечения. 28 сутки.

Окраска гематоксилином и эозином, × 200

Воспалительные инфильтраты часто распространялись на дерму, иногда даже с инфильтрацией кожного покрова. В околосуставной фиброзной ткани коллагеновые волокна формировали плотно упакованные пучки, между которыми определялись тонкие прослойки рыхлой соединительной ткани с бледной альциан-позитивной окраской. В субхондральных участках регистрировали клеточные пролифераты фибробластов, хондробласты и образования гомогенного хрящевого матрикса между ними. В зонах пролиферирующих хондробластов и в матриксе выявлялась интенсивная альциан-положительная реакция. В ряде случаев на фоне гомогенного хондромукоида определялись зоны пролиферации низкодифференцированных хондробластов эмбрионального типа с большим ядром и узким ободком цитоплазмы. Иногда эти клетки располагались радиально, иногда хаотично. В центре клеточных скоплений наблюдались кистозные полости и гранулемы с ячейками некробиотических изменений клеток. В других участках подобные клеточные пролифераты отсутствовали. Наряду с клеточными пролифератами в одних участках периартикулярной соединительной ткани наблюдались кистозные полости различных размеров, в других – фрагментированные, округлые очаги хрящевой ткани с альцианофильной реакцией со значительной дистрофией как матрикса, так и клеток (рис. 4).

СО состояла из утолщенных синовиальных складок за счет очагового разрастания фиброзной, жировой, иногда грануляционной ткани с диффузной воспалительной инфильтрацией. В ворсинах СО достаточно часто встречались большие скопления лимфоидных элементов с одиночными эпителиоидными и гигантскими многоядерными клетками, местами создавая гранулемы.

Отмечалось большое количество гипертрофированных синовиальных ворсин, некоторые из них были узкие и удлинённые, другие утолщенные. На многих участках поверхность СО и ворсин покрыта толстым слоем пролиферирующих синовиоцитов, как секреторного, так и фагоцитарного типов. Строма их была с отеком за счет увеличения количества кислых гликозаминогликанов, что подтверждалось позитивной окраской при использовании комбинированной ШИК-реакции с альциановым синим (рис. 5).

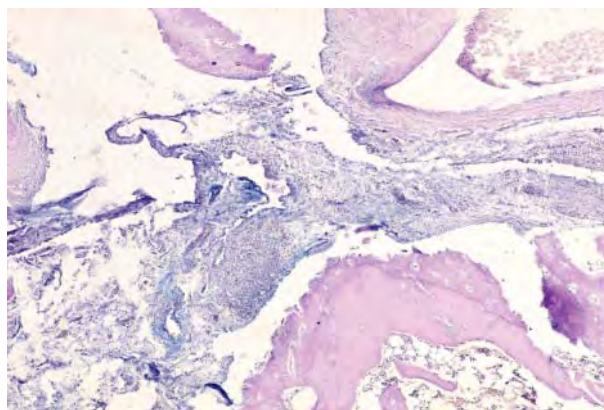


Рисунок 4 – Очаговые скопления альциан-положительных веществ в периартикулярной соединительной ткани с лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией и дегенеративными изменениями хряща. АА без лечения. 28 сутки. Комбинированная ШИК-реакция – альциановый синий, × 100

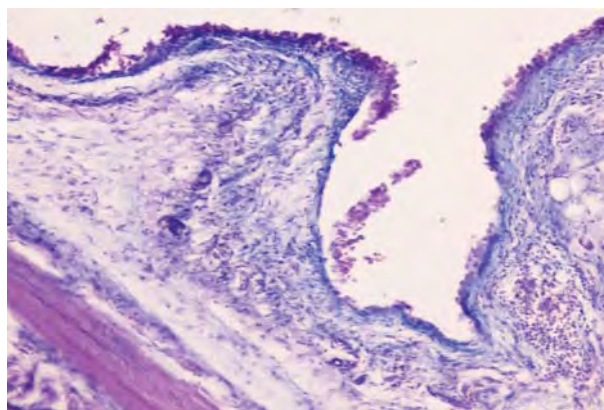


Рисунок 5 – Накопление кислых гликозаминогликанов (синего цвета) в фиброзной ткани синовиальных ворсин, очаговая пролиферация и десквамация синовиоцитов. АА без лечения. 28 сутки. Комбинированная ШИК-реакция – альцианового синим, × 200

Ниже расположенные хондроциты имели пикнотичные ядра, что свидетельствовало о локальном повреждении суставного хряща. В отличие от фиброзной ткани ворсин СО, в хондроцитах отмечали снижение продукции как кислых, так и сульфатированных гликозаминогликанов, что было хорошо заметно при окраске препаратов основным коричневым. В глубоких отделах СО определялось появление очагов волокнистой соединительной ткани с участками пролиферации фибробластов и местами кистоподобных просветлений (рис. 6). Клетки внутреннего слоя хряща были малодифференцированными, напоминали хондроциты, однако теряли ортохроматические окраски, типичные для гликозаминогликанов гиалинового хряща.

Хрящевые поверхности некоторых суставов были деформированы за счет синовита, граница между хрящом и соединительной тканью была почти незаметной. На тех поверхностях, где хрящ непосредственно контактировал с синовитом и паннусом, он утонченный, терял характерное зональное расположение хондроцитов.



Рисунок 6 – Уменьшение количества кислых и сульфатированных гликозаминогликанов в хрящевой ткани, кистоподобные просветления в окружающей сустав соединительной ткани.

АА без лечения. 28 суток.

Основной коричневый, $\times 100$

Большие участки суставной поверхности были практически лишены хрящевого покрова и выстланы грануляционной и фиброзной тканью. Вокруг грануляционной ткани, которая врастала в хрящ, отмечали замещения его вновь образованными костными балками или фиброзной тканью. Местами суставная поверхность на большей или меньшей протяженности абсолютно лишалась хрящевого покрова и замещалась грануляционной, фиброзной или жировой тканью, заполнявших иногда и костно-мозговые пространства.

Ячейки грануляционной ткани наблюдались в основном в промежуточных и глубоких зонах СО и состояли, главным образом, из капилляров, фибробластов, гистиоцитов, лимфоцитов и отдельных многоядерных клеток. В центральных отделах таких инфильтратов отмечали дегенеративные изменения основного вещества, которое было окружено соединительнотканскими волокнами. При окраске срезов по ван-Гизону склеротически измененные участки красились в красный цвет (рис. 7) и были очагово-положительными при использовании ШИК-реакции.

Во многих случаях как в ворсинах, так и во всей СО, выявлялся выраженный фиброз с уменьшением количества клеточных элементов. Внешний слой капсулы сустава был представлен грубоволокнистой плотной фиброзной тканью с наличием очагов жировой ткани. Коллагеновые волокна сливались в широкие гомогенные тяжи извилистой формы. Нередко встречались участки их гиалинизации или некроза с гибелью клеток, фибрилляцией волокон и накоплением мелких оксифильных комочков. Клеточные элементы определялись в малом количестве и были представлены, в основном, интенсивно окрашенными фиброцитами со сморщенными и вытянутыми ядрами. При использовании гистохимического метода по ван-Гизону коллагеновые волокна и стенки сосудов приобретали более яркий красный цвет.

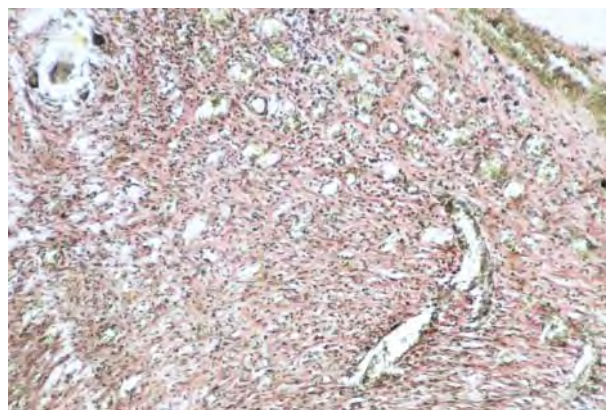


Рисунок 7 – Грануляционная ткань с большим количеством капилляров и периваскулярным разрастанием фиброзных волокон, единичные многоядерные клетки. АА без лечения. 28 суток.

Окраска по ван-Гизону, $\times 100$

ШИК-реакция коллагеновых пучков была неравномерной. Хрящевые клетки были разных размеров – от мелких с морщинистым ядром до больших со светлыми, набухшими ядрами. В отдельных хондроцитах ядра не проявлялись, поскольку были сморщены и располагались в виде полумесяцев под капсулой сустава.

В отличие от нелеченного АА у крыс, которым применяли ибупрофен и ибупрофен с винбороном грануляционная ткань на данном периоде исследования (28 суток) не проявлялась.

В группе АА, леченного ибупрофеном в глубоких отделах СО регистрировали значительное количество волокнистой соединительной ткани с очагами пролиферации фибробластов. Обращали на себя внимание и очаговые изменения в кровеносных сосудах, преимущественно артериального типа, в которых отмечали утолщение интимы за счет пролиферации эндотелия, гомогенизации мышечного слоя, периваскулярный склероз.

Морфометрический анализ клеточного состава воспалительных инфильтратов СО у крыс с АА без лечения установил статистически достоверное ($p \leq 0,05$) преобладание лимфоцитов, эпителиоидных клеток плазмоцитов и макрофагов над другими клеточными элементами. Так, количество лимфоцитов было увеличено на $232,5 \pm 40,8 \%$ ($6086,0 \pm 674,5$; 95% ДИ: 4763,7–7407,4 ед.), эпителиоидных клеток на $14,3 [7,1-105,4] \%$ ($800 [800-1400]$ ед.), плазмоцитов на $271,5 \pm 97,1 \%$ ($986,0 \pm 82,9$; 95% ДИ: 823,3–1148,2 ед.), макрофагов на $255,7 \pm 55,7 \%$ ($1228,6 \pm 60,6$; 95% ДИ: 1109,9–1347,4 ед.) в сравнении с показателями интактных крыс на 28 день эксперимента, что свидетельствовало о хронизации и иммунном характере воспаления (рис. 8 А, В, С, К).

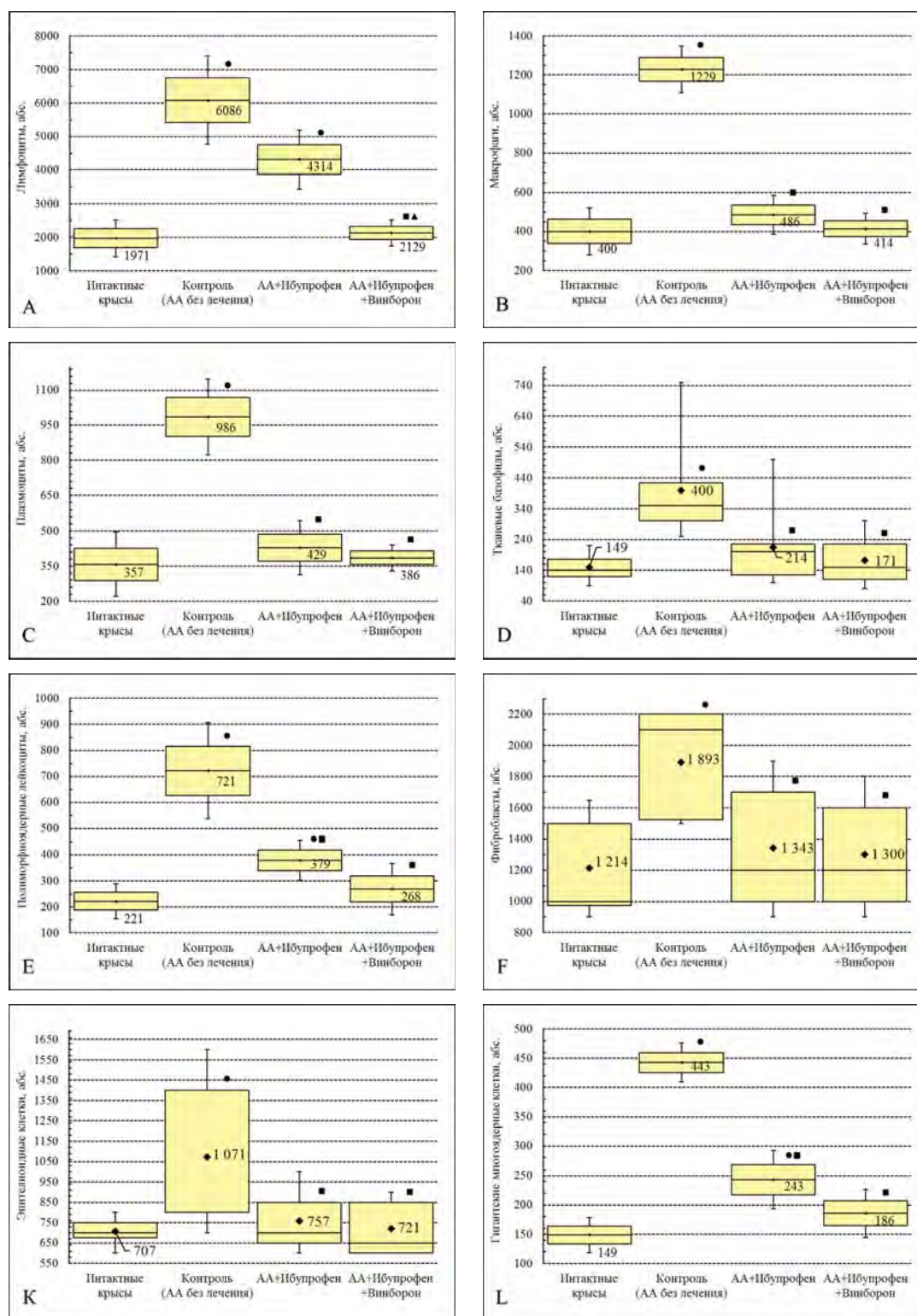


Рисунок 8 – Плотность клеточных элементов синовиальной оболочки голеностопного сустава крыс (из расчета на 1 мм²) при адьювантном артрите на 28 сутки эксперимента

Примечания:

- – $p \leq 0,05$ относительно интактных животных,
- – $p \leq 0,05$ относительно контрольных животных,
- ▲ – $p \leq 0,05$ относительно группы монотерапии ибупрофеном;

для рис. 8 А, В, С, Е, Л – распределение величин каждой группы выборочной совокупности нормальное. Боксы включают значение стандартной ошибки среднего арифметического, вертикальные линии за пределами боксов – 95 % доверительный интервал. Горизонтальная линия и число внутри бокса – среднее арифметическое значение;

для рис. 8 Д, Ф, К – распределение величин ненормальное. Боксы включают результаты от 25-го до 75-го перцентилей, вертикальные линии за пределами боксов – минимальное и максимальное значение. Горизонтальная линия внутри бокса – медиан, цифрами указано среднее арифметическое значение.

Наряду с лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрацией следует подчеркнуть достоверное ($p \leq 0,05$) увеличение количества тканевых базофилов (+ 150,0 [123,8–237,1] %) и фибробластов (+ 63,2 [40,0–88,3] %) в строме СО – 350,0 [300,0–425,0] ед. и 2100,0 [1525,0–2200,0] ед. соответственно, по сравнению с показателями животных других групп (см. рис. 8 D, F). Большая часть тканевых базофилов находилась в активном состоянии, о чем свидетельствовала их дегрануляция, которая хорошо проявлялась вокруг сосудов стромы СО при окраске основным коричневым (рис. 9).

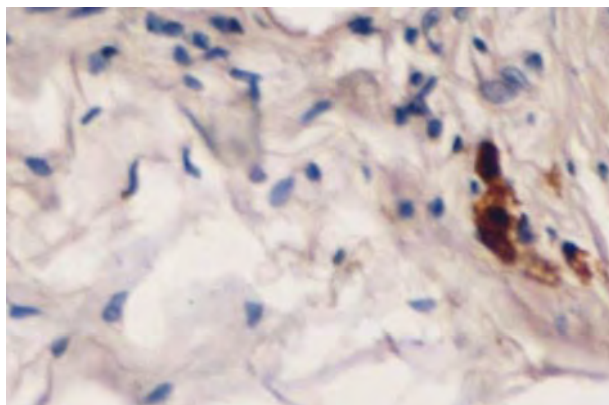


Рисунок 9 – Тканевые базофилы в состоянии дегрануляции вокруг сосудов стромы СО. АА без лечения. 28 дней. Основной коричневый, $\times 400$

Как видно из рисунка 8, в СО наблюдалась значительная пролиферация фибробластов, при этом количество их по данным морфометрического исследования возросла во всех исследуемых группах.

В группе крыс с АА, леченных ибупрофеном, рядом с участками дегенерации суставного хряща всегда сохранялись малоизменённые его участки, обычно свободные от синовиального паннуса. Лимфо-гистиоцитарные инфильтраты не выходили за пределы околосуставной соединительной ткани.

У экспериментальных животных с АА, которым вводили ибупрофен на 28 сутки отмечали умеренное воспаление в периартикулярной соединительной ткани, иногда с формированием эпителиоидной и гигантоклеточной гранулем, расстройство кровообращения, стаз в сосудах микроциркуляторного русла с незначительным периваскулярным отёком. Поверхностные дефекты хрящевой ткани были отмечены у 10,0% животных, леченных ибупрофеном, и практически не оказывались в группе комбинированного применения ибупрофена и винборона. Кожный покров имел обычную гистологическую структуру у 80,0% экспериментальных животных, леченных ибупрофеном, и у 90,0% крыс, которым вводили ибупрофен и винборон.

Микроскопически у крыс группы монотерапии ибупрофеном и группы комбинированного применения ибупрофена и винборона, также характерно фор-

мирование паннуса, однако интенсивность фибриллогенеза была значительно меньше по сравнению с нелеченным АА, что подтверждалось данными морфометрического исследования (см. рис. 8), иногда встречались небольшие участки, где соединительная ткань плотно срасталась с хрящевой. Изредка выявляли незначительные по длине бесклеточные участки и участки с очень узким хрящом, где хондроциты располагались только в 2–3 ряда. В отличие от нелеченного АА кислые и сульфатированные гликозаминогликаны при окраске препаратов альциановым синим в соединительной ткани СО практически не выявлялись, однако, количество их увеличивалось в хрящевой ткани, что подтверждалось положительной реакцией при использовании основного коричневого (рис. 10, 11).

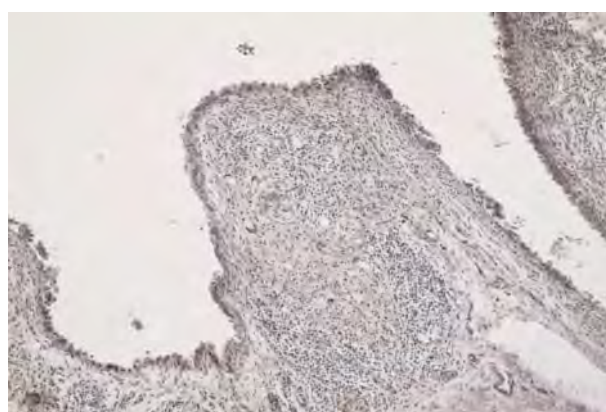


Рисунок 10 – Незначительная лимфоцитарная инфильтрация синовиальной ворсины с фиброзом стромы и небольшим количеством гликозаминогликанов. АА, леченный ибупрофеном. 28 сутки. Основной коричневый, $\times 200$

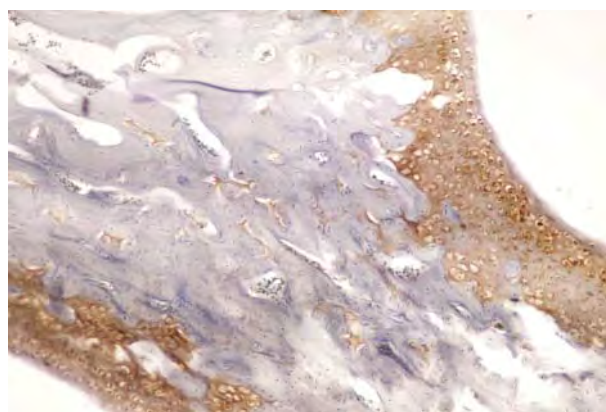


Рисунок 11 – Увеличение количества кислых и сульфатированных гликозаминогликанов в хондроцитах. АА, леченный ибупрофеном и винбороном. 28 сутки. Основной коричневый, $\times 100$

У крыс, которым применяли ибупрофен в комбинации с винбороном, коллагеновые волокна фиброзной периартикулярной ткани соединялись в толстые пучки и гомогенизировались. Очаги лимфо-плазматической инфильтрации регистрировались редко.

Чаще всего встречались инфильтраты из клеток фибро- и гистиоцитарного ряда. По сравнению с группой нелеченного АА и АА, леченного ибупрофеном, в хряще наблюдались менее выраженные дегенеративно-дистрофические и атрофические изменения. В базальных отделах хряща происходило усиление склерозирования межклеточного вещества и гибель клеток. Базальные отделы хряща и субхондральной пластинки часто оставались неразрушены и врастания сосудов в хрящ со стороны костно- мозговых полостей практически не наблюдалось.

У экспериментальных животных с АА, которые получали ибупрофен в комбинации с винбороном, на 28 день эксперимента установлено статистически достоверное снижение ($p \leq 0,05$) количества лимфоидных элементов на $63,6 \pm 3,3\%$ (95% ДИ: 57,2–70,1%) относительно показателей крыс с АА без лечения и составляло $2128,6 \pm 198,5$ (95% ДИ: 1736,6–5185,0) ед.,

что лишь на 19,8% превышало показатели интактных крыс ($1971,4 \pm 280,9$ (95 % ДИ: 1420,9–2522,0) ед.).

Уменьшение интенсивности воспалительной инфильтрации СО было зарегистрировано и при оценке плотности других воспалительных элементов (см. рис. 8). Тканевые базофилы, как и нейтрофильные лейкоциты встречались редко, в основном вокруг сосудов, что может свидетельствовать об уменьшении синтеза и высвобождения медиаторов воспаления (серотонина, гистамина) из тканевых базофилов.

Лучевое исследование показало, что на 28 сутки эксперимента у крыс с АА без лечения отмечалось гиперэкстензия проксимальных фаланг со сгибанием в проксимальных межфаланговых суставах и разгибанием в дистальных межфаланговых суставах, что обуславливало формирование классических для ревматического поражения изменений – «молоткообразной» деформации II–V пальцев (рис. 12).



Рисунок 12 – Рентгенограммы задних конечностей крыс с адьювантным артритом без лечения на 28 сутки эксперимента в прямой проекции.

По данным КЛКТ субплантарная инокуляция СФА привела к увеличению объема всех суставов задних конечностей почти вдвое ($+ 90,1\%$) относительно показателей интактных крыс. Наибольший прирост объема отмечался в I и V плюсна-плюсневых суставах соответственно на $142,6\%$ ($p < 0,001$) и $162,0\%$ ($p < 0,01$) относительно значений интактных животных. Среди плюснефаланговых суставов отчетливо выросли объемы I и V плюснефаланговых суставов – соответственно на $130,6\%$ ($p < 0,005$) и $133,5\%$ ($p < 0,001$) относительно показателей интактных животных. Наименьшие изменения объема суставов задних конечностей у крыс было отмечено в межфаланговых суставах, а средний прирост объема составил $52,7\%$ относительно рассчитанных объемов суставов здоровых животных (табл. 1)

На фоне комбинированного применения ибупрофена и винборона нами было отмечено наибольшее замедление прогрессирования воспалительного процесса. На это указывало уменьшение объема суставов на фоне комбинированного лечения крыс с АА в среднем на $33,8\%$ относительно показателей животных контрольной группы.

Характеризуя состояние суставных щелей задних конечностей у крыс, следует отметить, что развитие АА привело к значительному уменьшению ширины суставных щелей в среднем на $58,8\%$ относительно значений интактных животных. Это согласуется с данными литературы об изменениях структурной организации суставов при ревматоидном артрите [2, 36–37]. Стоит отметить, что в I и II плюснефаланговых суставах и проксимальном межфаланговом суставе I пальца стопы нами был выявлен полный анкилоз, а в III–V плюснефаланговых суставах ширина суставной щели не превышала $0,2$ мм, что более чем вдвое было ниже показатели интактных животных (см. табл. 1).

На фоне монотерапии ибупрофеном было отмечено увеличение ширины суставной щели всех суставов, однако на фоне комбинированного применения ибупрофена и винборона нами было отмечено более отчетливое увеличение ширины суставных щелей, которая практически сопоставлялась с показателями интактных животных, что указывает на способность винборона усиливать противовоспалительные свойства ибупрофена.

У интактных крыс между объемом суставов и шириной суставных щелей задних конечностей отмечено умеренная корреляционная связь ($q = 0,373 \pm 0,10$; 95% ДИ: 0,17–0,57). Развитие АА у крыс привело к снижению ($p > 0,05$) значения коэффициента Спирмана (q) на 23,0% относительно показателей интактных крыс и он составил соответственно $0,282 \pm 0,05$; 95% ДИ: 0,19–0,38, что указывает на снижение силы корреляционных связей (СКС) между исследуемыми показателями. Монотерапия АА ибупрофеном привела к незначительному увеличению СКС ($q = 0,295 \pm 0,04$; 95% ДИ: 0,21–0,38). Комбинированное применение ибупрофена и винборона привело к восстановлению ($p > 0,05$) СКС между объемом суставов и шириной суставных щелей ($q = 0,365 \pm 0,09$; 95% ДИ: 0,20–0,53), что указывает на гармонизацию противовоспалительного действия ибупрофена при его совместном применении со спазмолитиком украинского производства, которому присущие политропные фармакологические свойства.

Заключение. Проведенное исследование показало, что у экспериментальных животных с нелеченым АА на 28 день эксперимента патологические изменения регистрировались преимущественно в капсуле суставов с характерной фиброзно-кистозной трансформацией периартикулярной соединительной ткани, образованием паннуса в хрящевой поверхности суставов. Патоморфологической особенностью нелеченого АА, наряду с образованием паннуса, диффузной лимфогистиоцитарной инфильтрацией и деструкцией костной ткани, также было выявление грануляционной ткани на данном сроке наблюдения, что свидетельствовало о хроническом характере воспалительного ответа и нарушение регенераторных свойств синовиального эпителия.

Применение ибупрофена в комбинации с винбороном сопровождалось восстановлением структуры и функции хрящевой и костной ткани, о чем свидетельствовало появление кислых и сульфатированных гликозаминогликанов. Восстановление костной ткани реализовывалось путем разрастания соединительной ткани и трансформации ее в хрящ. СО была гиперплазированной с пролиферирующими синовиоцитами как макрофагального, так и секреторного типов. Только в редких случаях сохранялись явления умеренного отека и незначительная очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация. Таким образом, применение ибупрофена в комбинации с винбороном у крыс с АА приводило к уменьшению или отсутствию воспаления как в суставе, так и в периартикулярных тканях.

Анализ результатов конусно-лучевой компьютерной томографии и цифровой рентгенографии показал, что на фоне одновременного введения ибупрофена и винборона отмечается тенденция к усилению противовоспалительного действия исследуемого антифлогистика на пораженные адьювантным артритом суставы крыс. На это указывало уменьшение на 28 сутки эксперимента объема суставов задних конечностей в среднем на 33,8% относительно показателей контрольных животных и практически полное восстановление ширины суставных щелей исследуемых суставов. Также установлено, что винборон способен гармонизировать противовоспалительное действие ибупрофена при их совместном применении.

Благодарности. Авторы выражают благодарность за квалифицированную помощь в проведении рентгенологических исследований ассистентам кафедры радиологии и радиационной медицины Ивано-Франковского национального медицинского университета Погребенник Я. Я. и Юркевичу Б. Е.

Таблица 1 – Корреляция объема мелких суставов (мм^3) и ширины суставных щелей (мм) задней конечности крыс с адьювантным артритом на фоне применения ибупрофена и его комбинации с винборона по данным конусно-лучевой компьютерной томографии ($M \pm m$ или Me [IQR; LQ; UQ], $n = 7$)

№ п/п	Условия эксперимента	I группа		II группа		III группа		IV группа	
		Интактные крысы		Адьювантный артрит без лечения (контроль)		Адьювантный артрит + Ибупрофен (218 мг/кг, в/ж)		Адьювантный артрит + Ибупрофен (218 мг/кг, в/ж) + Винборон (11 мг/кг, в/ж)	
		Объём сустава, мм^3	Ширина суставной щели, мм	Объём сустава, мм^3	Ширина суставной щели, мм	Объём сустава, мм^3	Ширина суставной щели, мм	Объём сустава, мм^3	Ширина суставной щели, мм
1	Первый плюснефаланговый сустав (<i>art. metatarsophalangeae I</i>)	3,00 [2,83; 3,92]	0,4 [0,4; 0,5]	6,92 [5,83; 7,38] $p_1 < 0,005$ (+130,6 %)	0 [0; 0,05] $p_1 < 0,005$	6,23 [5,81; 6,73] $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ (-10,0 %)	0,2 [0,15; 0,20] $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$	3,86 [2,92; 4,45] $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ (-44,3 %) $p_3 > 0,05$	0,3 [0,25; 0,30] $p_1 < 0,05$ (-25%) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
		$q = 0,16$; $p = 0,7$		$q = 0,25$; $p = 0,6$		$q = 0,61$; $p = 0,13$		$q = -0,16$; $p = 0,7$	
2	Второй плюснефаланговый сустав (<i>art. metatarsophalangeae II</i>)	5,38 [4,71; 5,81]	0,5 [0,4; 0,5]	9,12 [7,78; 9,96] $p_1 < 0,005$ (+69,4 %)	0 [0; 0,05] $p_1 < 0,005$	5,89 [4,82; 8,64] $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ (-35,5 %)	0,2 [0,20; 0,25] $p_1 < 0,005$ (-60%) $p_2 < 0,05$	5,38 [4,83; 6,10] $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ (-41,0 %) $p_3 > 0,05$	0,3 [0,2; 0,3] $p_1 < 0,005$ (-40%) $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
		$q = -0,78$; $p = 0,04$		$q = -0,04$; $p = 0,9$		$q = -0,16$; $p = 0,7$		$q = -0,12$; $p = 0,8$	
3	Третий плюснефаланговый сустав (<i>art. metatarsophalangeae III</i>)	4,22 [3,64; 5,61]	0,4 [0,30; 0,45]	8,74 [6,60; 9,94] $p_1 < 0,05$ (+107,1 %)	0,2 [0,20; 0,25] $p_1 < 0,05$ (-50,0%)	5,65 [4,77; 5,78] $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$ (-35,3 %)	0,4 [0,3; 0,4] $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$	4,42 [3,86; 4,71] $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ (-49,4 %) $p_3 > 0,05$	0,4 [0,35; 0,40] $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
		$q = 0,98$; $p < 0,001$		$q = -0,4$; $p = 0,37$		$q = -0,41$; $p = 0,36$		$q = 0,79$; $p = 0,03$	
4	Четвёртый плюснефаланговый сустав (<i>art. metatarsophalangeae IV</i>)	4,83 [4,64; 5,22]	0,5 [0,35; 0,50]	8,36 [6,72; 9,14] $p_1 < 0,05$ (+73,0 %)	0,2 [0,2; 0,3] $p_1 < 0,05$ (-60%)	5,02 [4,45; 8,76] $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ (-39,9 %)	0,3 [0,3; 0,4] $p_1 > 0,05$ (-40%) $p_2 > 0,05$ (+50%)	4,99 [4,43; 6,13] $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ (-40,3 %) $p_3 > 0,05$	0,4 [0,3; 0,4] $p_1 > 0,05$ (-20%) $p_2 < 0,05$ (+100%) $p_3 > 0,05$
		$q = 0,48$; $p = 0,28$		$q = -0,60$; $p = 0,15$		$q = -0,24$; $p = 0,6$		$q = 0,58$; $p = 0,17$	

Окончание таблицы 1

5	Пятый плюснефаланговый сустав (<i>art. metatarsophalangeae V</i>)	3,51 ± 0,38	0,4 [0,4; 0,4]	8,20 ± 0,57 p ₁ < 0,001 (+133,5 %)	0,2 [0,20; 0,25] p ₁ < 0,005 (-50%)	4,44 ± 0,56 p ₁ > 0,05 p ₂ < 0,001 (-45,8 %)	0,3 [0,30; 0,35] p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05	4,05 ± 0,47 p ₁ > 0,05 p ₂ < 0,001 (-50,6 %) p ₃ > 0,05	0,3 [0,3; 0,3] p ₁ < 0,01 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05
6	Проксимальный межфаланговый сустав первого пальца стопы (<i>art. interphalangeae proximalis I</i>)	q = 0; p = 1		q = 0,16; p = 0,7		q = 0; p = 1		q = -0,62; p = 0,14	
		1,96 ± 0,21	0,3 [0,25; 0,30]	2,88 ± 0,53 p ₁ > 0,05 (+46,4 %)	0 [0; 0,2] p ₁ < 0,05	1,93 ± 0,22 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 (-33,0 %)	0,3 [0,2; 0,3] p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05	1,69 ± 0,24 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 (-41,1 %) p ₃ > 0,05	0,3 [0,3; 0,3] p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05
		q = 0,47; p = 0,28		q = -0,32; p = 0,49		q = 0,48; p = 0,27		q = 0; p = 1	
7	Проксимальный межфаланговый сустав второго пальца стопы (<i>art. interphalangeae proximalis II</i>)	2,35 ± 0,19	0,3 [0,30; 0,45]	3,04 ± 0,50 p ₁ > 0,05 (+29,5 %)	0,1 [0; 0,3] p ₁ < 0,05 (-67%)	2,86 ± 0,28 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 (-6,1 %)	0,3 [0,1; 0,3] M±m: 0,21±0,06 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05	2,62 ± 0,39 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 (-13,9 %) p ₃ > 0,05	0,2 [0,2; 0,3] M±m: 0,26±0,04 p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05
8	Проксимальный межфаланговый сустав третьего пальца стопы (<i>art. interphalangeae proximalis III</i>)	2,09 ± 0,12	0,3 [0,3; 0,4]	3,30 ± 0,39 p ₁ < 0,05 (+58,1 %)	0,2 [0,1; 0,2] p ₁ < 0,05 (-33%)	2,49 ± 0,25 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 (-24,6 %)	0,3 [0,3; 0,3] p ₁ > 0,05 p ₂ < 0,05	2,27 ± 0,42 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 (-31,1 %) p ₃ > 0,05	0,3 [0,25; 0,30] p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05
9	Проксимальный межфаланговый сустав четвёртого пальца стопы (<i>art. interphalangeae proximalis IV</i>)	q = 0,12; p = 0,8		q = 0,32; p = 0,48		q = 0,2; p = 0,66		q = -0,16; p = 0,73	
		1,98 ± 0,09	0,4 [0,4; 0,4]	3,13 ± 0,29 p ₁ < 0,005 (+51,5 %)	0,1 [0; 0,2] p ₁ < 0,005 (-75%)	3,04 ± 0,55 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 (-18,3 %)	0,3 [0,15; 0,30] p ₁ < 0,005 p ₂ > 0,05	2,45 ± 0,37 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 (-33,7 %) p ₃ > 0,05	0,3 [0,30; 0,35] p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05
10	Проксимальный межфаланговый сустав пятого пальца стопы (<i>art. interphalangeae proximalis V</i>)	q = -0,31; p = 0,5		q = 0,32; p = 0,48		q = 0,08; p = 0,87		q = 0,48; p = 0,27	
		1,46 ± 0,22	0,3 [0,3; 0,3]	2,50 ± 0,12 p ₁ < 0,005 (+77,8 %)	0,2 [0,15; 0,20] p ₁ > 0,05 (-33%)	2,17 ± 0,24 p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05 (-17,6 %)	0,2 [0,15; 0,25] p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05	1,92 ± 0,34 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 (-25,6 %) p ₃ > 0,05	0,3 [0,2; 0,3] p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05
		q = 0; p = 1		q = 0,2; p = 0,67		q = -0,43; p = 0,3		q = 0,58; p = 0,17	

Примечания:

p_1 – уровень статистической значимости относительно интактных животных; p_2 – уровень статистической значимости относительно контрольных животных; p_3 – уровень статистической значимости в отношении группы монотерапии ибупрофеном.

Introduction. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are the main class of medicines used in rheumatology. Suppression of inflammation is one of the main tasks of pathogenetic therapy of rheumatic diseases, since it is with a chronic inflammatory reaction that the progression of irreversible structural changes in the joints is associated [1, 2]. In the anti-inflammatory effect of NSAIDs, blockade of cyclooxygenase, a decrease in the synthesis of prostaglandins, an anti-bradykinin effect, a reduction in the permeability of the vascular wall are considered important. NSAIDs inhibit free radical reactions, stabilize lysosomal membranes, prevent the release of lysosomal enzymes, prevent the activation of immunocompetent cells in the early stages of inflammation, reduce energy metabolism, fibroblast division and collagen synthesis, reduce the severity of hyperergic inflammation, hyperemia, edema, pain, the degree of tissue destruction [1, 2].

However, the achievement of the structural and modifying effect of NSAIDs in rheumatic diseases - suppression of ectopic ossification through inhibition of osteoclast activation, neoangiogenesis and enhancement of cellular apoptosis - is possible only when administered in submaximal / maximal therapeutic doses and for a long term, since autoimmune inflammation has a self-sustaining, cyclic nature. In this situation, the risk of class-specific complications may be the main factor limiting the therapeutic potential of these drugs [1–4].

Unfortunately, unwanted reactions with NSAIDs are related to reactions of type A – frequent, predictable side effects, which are a consequence of a known pharmacological mechanism, and can be observed in any patient. The most frequent adverse reactions in the use of NSAIDs are gastro- and enterotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity, thrombotic complications, decreased synthesis of proteoglycans of the cartilaginous tissue, and allergic reactions [3–11].

In our previous studies we have found out that Ukrainian vinboron, the antispasmodic with polytrophic pharmacological effects, can improve the safety profile of the popular non-steroidal antiphlogistics ibuprofen and can also potentiate its anti-inflammatory effect. That fact has become the background to a detailed study of the therapeutic action mechanisms of these drugs when they are used together [12–16].

Aim of the study. To characterize the influence of vinboron (11 mg/kg, i.g.) on the anti-inflammatory activity of ibuprofen (218 mg/kg, i.g.) when combined, in a model of experimental rheumatoid arthritis according to pathomorphological, morphometric and cone-ray computerized tomography of rats' hind limbs.

Materials and methods. The study was carried out on 28 mature male rats divided into 4 groups: I – intact rats (n = 7), II – rats with modeled AA without treatment (control), III – rats with AA (n = 7), treated with ibuprofen (218 mg/kg, intragastrical), IV – rats with AA (n = 7), ibuprofen treated (218 mg/kg, intragastrical) in combination with vinboron (11 mg/kg, intragastrical).

To reproduce the conditions for the administration

of ibuprofen corresponding to its clinical use, we selected a model of experimental rheumatoid arthritis (RA) – adjuvant arthritis (AA, another name – Pearson's arthritis (Pearson S.M. et al., 1959) in rats that has all morpho-functional signs of RA and is accompanied by a typical reaction, the main link of which is T-cell immunity [17].

AA was modeled by subcutaneous administration of a complete Freund's adjuvant – CFA (*Thermo scientific, USA*), 100 µl/per rat) that contains polysaccharides of heat-killed Koch bacillus (*Mycobacterium tuberculosis* – Mtb, 5 mg/ml) and complex fatty acids (lanolin derivatives) with an emulsifier (petroleum jelly) at the ratio of 1:2 to the right hind limbs of rats [18–23]. The day of the adjuvant administration was counted as Day 0 (zero-day) of the experiment.

Treatment AA was conducted from 14 to 28 days by intragastrical administration of the drugs under study. The onset of drug administration corresponded to the maximum inflammatory response [18–19]. Ibuprofen (*Pharmaceutical Company «Darnitsa», Ukraine*) was administered intragastrically as a suspension based on polyoxymethylene (20) sorbitan monooleate emulsifier (the other names are: *Tween 80, Polysorbate-80, E433*) and water pro injectionibus (*Limited Liability Company «Galichpharm», Ukraine*), vinboron (*Privatne Accessionary Partnership The Science Center of the Vibration Center «Borschagiv Chemically Pharmaceutical Plant», Ukraine*), dissolved in water pro injectionibus (*Limited Liability Company «Galichpharm», Ukraine*), was administered 60 minutes before the administration of ibuprofen, twice in day.

To extrapolate the average therapeutic doses for humans to equivalent efficiency doses for rats, we recalculated the data by Rybolovlev's method (Rybolovlev Yu. R. et al., 1979) [24]. The dose of ibuprofen (*Pharmaceutical Company «Darnitsa», Ukraine*) for a human being is 2400 mg (0.8 g 3 times a day), which has a sufficient anti-inflammatory activity and is recommended for treatment of RA [1–2, 25]. If recalculated, in efficiency this is an equivalent dose for rats (218 mg/kg).

The dose of vinboron (*Privatne Accessionary Partnership The Science Center of the Vibration Center «Borschagiv Chemically Pharmaceutical Plant», Ukraine*) for a human being 120 mg (for 0.04 g 3 times a day), which is recommended for use in the treatment of patients with peptic ulcer of the stomach and duodenum corresponds to a dose for rats of 11 mg/kg [26–28].

The dose of vinboron (*Privatne Accessionary Partnership The Science Center of the Vibration Center «Borschagiv Chemically Pharmaceutical Plant», Ukraine*) for a human being recommended for treatment of patients with peptic ulcer of the stomach and duodenum is 120 mg (0.04 g 3 times a day), and it corresponds to the dose for rats of 11 mg/kg [26–28].

The animals were euthanized on the 28th day of the experiment by a cervical dislocation under inhaled trichloromethane (CHCl₃) anesthesia. It was followed by the amputation of the hind limbs at the level of the hocks (art. coxae) and fixation of the material in 10.0% aqueous

solution of neutral formalin. The ankle joints were decalcified. The drugs were prepared according to the standard procedure, histological sections 5–7 microns thick were stained with hematoxylin and eosin, picrofuxin sensu van Gieson, the main brown sensu Shubich, the combination of the main brown and strong green dye, and the Periodic Acid – Schiff (PAS) reaction with alcian blue [29–33]. Microscopy and photographing of histological preparations were carried out with the light microscope OLIMPUS BX 41 at magnifications of 40, 100, 200 and 400 times. The obtained images were processed and morphometry was carried out with the program “Quick PHOTO MICRO 2.3”. The contents of the cellular elements was determined on the basis of the equivalent unit area (1 mm²). Our morphometric studies were based on the principles set forth in the manual by Avtandilova G.G. (2002) [29].

According to the data obtained by Aurell Y. et al. (2014) [34], in the diagnosis of RA an informative method of instrumental diagnosis is computerized tomogra-

phy. Taking into account the small size of the investigated material, we performed Cone Beam Computerized Tomography (CBCT).

The study was carried out on the basis of the Center for Medical 3D Diagnostics (Lviv, Ukraine) using a digital panoramic cone-ray tomographic scanner “Point 3D Combi 500” (PointNix, South Korea), using a planar sensor with a scanning site of 9 × 12 mm and a radial load of 30–100 μSv [35–38]. Scanning was carried out with a voltage of 52.0 kV and the electric current of 6.0 mA which had been determined empirically as optimal for the study of the hind limbs of rats. The multiplanar reconstruction (Multi-Planar Reconstruction – MPR) of bone structures was performed on the basis of the software “RealScan” with high resolution.

Using the “RealScan-CD Viewer” software (PointNix, South Korea), joint width and height measurements were carried out, and the width of the joint gap was determined (Fig. 1).



Figure 1 – Cone-ray tomogram of the rat foot in the program window «RealScan – CD Viewer»

The measurements of the investigated parameters were carried out according to the unified algorithms: the width of the joint was determined in the frontal plane with preliminary adjustment of the vector lines parallel to the longitudinal axes of the bone structures of the study site and an increase in the thickness of the shear display up to 2 mm.

The measurements of the height of the joint was carried out along its middle part in the sagittal plane with the preliminary adjustment of the sagittal vector parallel to the longitudinal axis of the proximal tubular bone, with an additional increase in the thickness of the shear display up to 2 mm. The width of the articular slots was measured between the end plates of the articular surfaces in the frontal (rarely sagittal) plane with the preliminary adjustment of the vector lines, according to the above techniques. The proposed algorithm made it possible to minimize the phenomena of spatial superposition of anatomical structures.

For the integral characteristics of the linear dimensions of the joints of the hind limbs of rats, we proposed a formula for calculating the joint volume (Patent of Ukraine No. UA 117538) [39]. The cylinder was conventionally chosen as the nearest figure of the corresponding spatial organization of small joints (fig. 2).

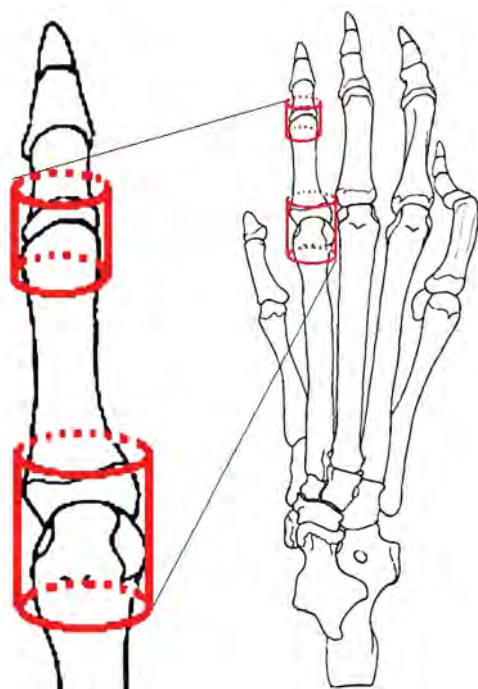


Figure 2 – Evaluation of the small joints volume on the basis of geometric modeling as illustrated by metatarsophalangeal and proximal interphalangeal joints of the second finger of the hind right limb of a rat

The height of the cylinder was taken as the height of the joint. The radius of the cylinder was calculated as half the width of the joint, which was measured in the frontal plane ($R = \frac{1}{2}$ of the joint width, mm). The volume was calculated by the formula $V = \pi \times R^2 \times h$, where V is the joint volume (mm^3), π is the mathematical constant reflect-

ing the ratio of the circumference to its diameter and it is 3.14; R is the radius of the circumference at the base of the cylinder ($\frac{1}{2}$ of the joint width, mm) h is the height of the cylinder (joint height in the sagittal plane, mm) [39].

The evaluation of the effectiveness of anti-inflammatory therapy was carried out by comparing the volumes of ten joints (I – V metatarsophalangeal and proximal interphalangeal joints of I – V of the toes) calculated by the linear dimensions obtained, the width and height of the bone rows of the mold and metatarsal, and the width of the articular clefts of ten joints (I – V metatarsophalangeal and proximal interphalangeal joints of the joints of I – V of the toes of the foot) under different experimental conditions and comparing the width of the joint gap in corresponding joints. The discrepancies were expressed in % with respect to the indices of intact animals and animals with AA without treatment.

All the experimental studies on laboratory animals were conducted in accordance with the requirements of good laboratory practice (GLP) and in compliance with the main provisions of the Council of Europe Convention on the Protection of Vertebrate Animals used in experiments and other scientific purposes of March 18, 1986, the Directive of the European Parliament and Council EU 2010/63/EC of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes; Order of the Ministry of Health of Ukraine from December 14, 2009, No. 944 “On approval of the procedure for preclinical study of medicinal products and examination of materials for preclinical study of medicinal products” and the Law of Ukraine of February 21, 2006 No. 3447-IV “On the Protection of Animals from Cruel Treatment” [40].

Statistical processing of the obtained results was carried out using the application program for working with spreadsheets “Microsoft Office Excel 2003; 2013” (Microsoft Corporation, USA) using the “Real Statistics” extension in the Windows XP Professional environment (Microsoft Corporation, USA). The character of the distribution of the values in each group of the sample was estimated using W value in Shapiro-Wilk test ($n < 50$).

The homogeneity of the dispersions was determined by Levene’s test. To assess the significance of the revealed differences in the studied parameters under different experimental conditions, a statistical analysis was performed using parametric and nonparametric criteria. Since all the investigated quantities obeyed the law of normal distribution (Gauss-Laplace’s distribution), the reliability of the differences between them was determined in pairs by Student’s criterion. The values obtained were compared with the critical values at the confidence level above 95.0% ($p \leq 0.05$), above 99.0% ($p \leq 0.01$), above 99.5% ($p \leq 0.005$), and above 99.9% ($p \leq 0.001$) and the conclusion about the error probability was made.

At the abnormal distribution of at least one of the groups of independent quantities, the differences between them were determined in pairs by the nonparametric U-criterion ranked by Mann-Whitney.

To evaluate the relationship between variables under the condition of normal distribution of values, the one-factor correlation analysis was carried out according

to Pearson or the rank correlation analysis sensu Spearman with an abnormal distribution. By the value of the absolute value sensu Pearson coefficient (r) or sensu Spearman coefficient (ρ), the correlation relation was characterized by the following criteria: $r < 0$ – feedback; $0 \leq |\rho| < 0.1$ – no connection; $0.1 \leq |\rho| < 0.3$ – weak; $0.3 \leq |\rho| < 0.7$ – moderate; $0.7 \leq |\rho| < 0.99$ – strong; $0.99 < |\rho| \leq 1$ – full (functional) and indicated the probability of error (p) of the identified links. The character of the direction of the connection was determined depending on the sign of the correlation coefficient: a direct connection with a positive sign (+) and an inverse in the case of a negative sign (–).

Digital data in the case of a normal distribution of quantities are given in the form “ $M \pm m$ ” ($M \pm SE$), where M is the arithmetic meaning, m (SE) is the standard error of the arithmetic meaning or M (95% CI: 5%–95%), where 95% CI is 95% Confidence interval (CI). With an abnormal distribution of the values obtained, the data are presented in the form $Me [LQ; UQ]$, where Me is the median $[LQ; UQ]$, i.e. the upper limit of the lower (first) quartile (lower quartile – LQ) and the lower limit of the upper (third) quartile (upper quartile – UQ).

For the graphical representation of the data, the box-and-whiskers diagrams were selected. On them the maximum and minimum values were displayed in the case of an abnormal distribution of values or a 95% confidence interval in the normal distribution, the Interquartile range (IQR) in the form of a box from the 25-th to the 75-th percentile in the case of an abnormal distribution of values or the boundary of the standard error of the arithmetic meaning at the normal distribution of quantities, the median and / or the average arithmetic meaning [41].

Results and discussion. On the 28-th day of the experiment, a pathomorphological study of the synovial membrane (SM, synovium) of the ankles of the experimental animals with AA without treatment showed a predominance of chronic productive inflammation with a significant proliferative component and degenerative - dystrophic changes in the cartilage and fibrous connective tissue surrounding the synovial cartilage.

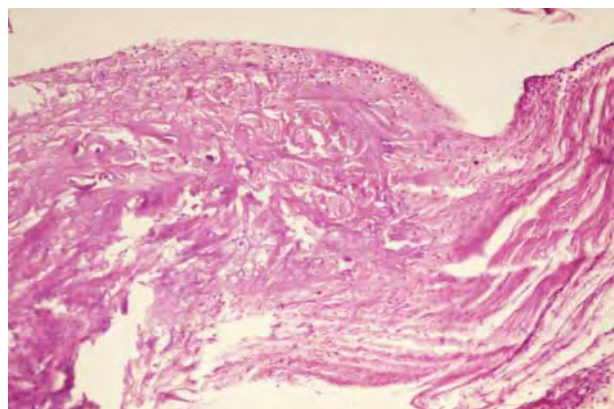


Figure 3 – Degenerative changes in cartilage with the formation of pannus. AA without treatment. 28th day. Stained with hematoxylin and eosin, $\times 200$

The articular surface lost its boundaries, often with uneven contours, had various depth defects, which were observed in 60.0% of animals with untreated AA. Almost all the animal cartilage specimens studied in the control group of animals showed signs of pannus formation, which sometimes completely invaded the cartilage, replacing it with a connective tissue (fig. 3). In periarticular tissues, along with their edema, massive cell infiltration, mainly lymphoid with accumulation of plasmocytes, giant multinucleate cells, forming granulomas, which were surrounded by collagen fibers, was noted.

Inflammatory infiltrates often extended to the dermis, sometimes even with the infiltration of the skin. In the periarticular fibrous tissue, the collagen fibers formed densely packed bundles, between which thin layers of loose connective tissue with a pale alcian-positive color were detected. In the subchondral regions, cellular proliferates of fibroblasts, chondroblasts and the formation of a homogeneous cartilage matrix between them were recorded. In the zones of proliferating chondroblasts and in the matrix, an intense alcian-positive reaction was detected. In a number of cases against a background of homogeneous chondromucoid the zones of proliferation of low-grade chondroblasts of embryonic type with a large nucleus and a narrow rim of the cytoplasm were detected.

Sometimes these cells were located radially, sometimes chaotically. Cystic cavities and granulomas with cells of necrobiotic cell changes were observed in the center of cellular clusters. In other areas similar cellular proliferates were absent. Along with cellular proliferates, cystic cavities of various sizes were observed in some parts of the periarticular connective tissue, in others fragmented, rounded foci of cartilaginous tissue with an alcianophilic reaction with significant dystrophy of both the matrix and the cells could be observed (Fig. 4).

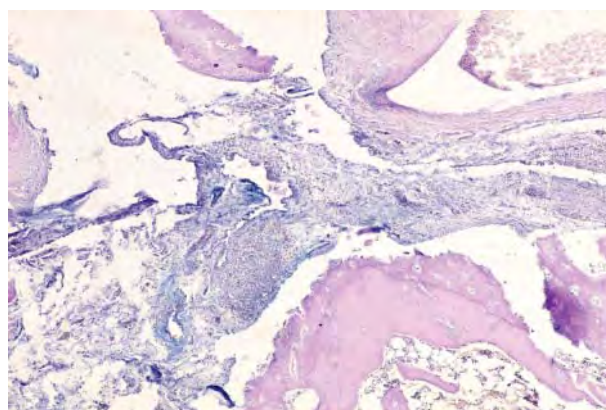


Figure 4 – Focal clusters of alcian-positive substances in periarticular connective tissue with lymphoplasmocytic infiltration and degenerative cartilage changes. AA without treatment. 28th day. Combined Schick Test – alcian blue, $\times 100$

Synovium consisted of thickened synovial folds due to the focal proliferation of fibrous, fatty, sometimes granulation tissue with diffuse inflammatory infiltration. Large clusters of lymphoid elements with single epithelioid

and giant multinucleate cells were found frequently in the villi of the SM, sometimes creating granulomas.

A large number of hypertrophic synovial villi was noted, some of them were narrow and elongated, others were thickened. In many areas the surface of synovium and villi was covered with a thick layer of proliferating synoviocytes, of both – secretory and phagocytic types. Their stroma was with edema due to an increase in the number of acidic glycosaminoglycans, which was confirmed by a positive coloration when using a combined Schick test with alcian blue (fig. 5).

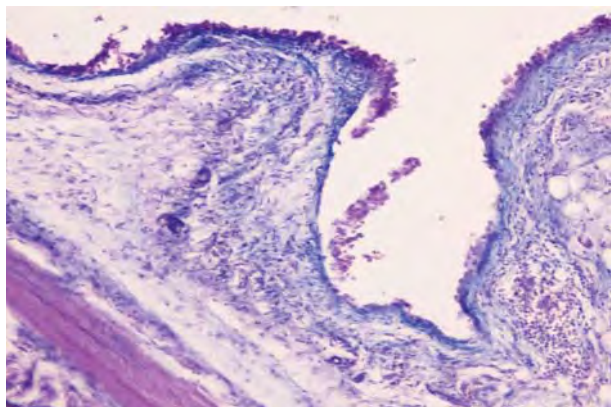


Figure 5 – Accumulation of acid glycosaminoglycans (blue) in fibrous tissue of synovial villi, focal proliferation and desquamation of synoviocytes. AA without treatment. 28th day. Combined PAS-reaction – alcian blue, $\times 200$

The chondrocytes located below had pycnotic nuclei, which indicated the local damage to the articular cartilage. In contrast to the fibrous tissue of the villi SM the chondrocytes were observed to reduce the production of both acidic and sulfated glycosaminoglycans, which was clearly visible when the preparations were stained brown. In the deep sections of the SM, the emergence of foci of fibrous connective tissue with areas of proliferation of fibroblasts and places of cystic enlightenments was determined (Fig. 6).

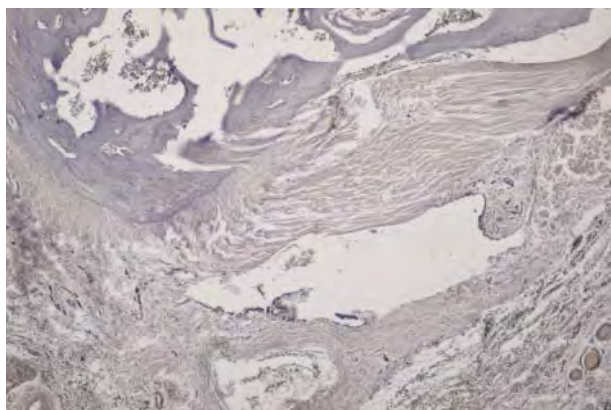


Figure 6 – Reduction in the number of acidic and sulfated glycosaminoglycans in the cartilaginous tissue, cystic enlightenment in the surrounding joint of the connective tissue. AA without treatment. 28th day. Basic brown, $\times 100$

The cells of the inner cartilage layer were slightly differentiated, resembling chondrocytes, but lost the orthochromatic stains typical of glycosaminoglycans of hyaline cartilage.

The cartilage surfaces of some joints were deformed due to synovitis, the border between cartilage and connective tissue was almost invisible. On the surfaces where the cartilage directly contacted the synovitis and pannus, it was refined, losing the characteristic zonal location of the chondrocytes. The large areas of the articular surface were practically devoid of the cartilaginous cover and lined with granulation and fibrous tissue. The granulation tissue that was growing into the cartilage was marked by the replacement of its newly formed bone girders or fibrous tissue around it. In some places the joint surface was completely deprived of the cartilaginous cover to a greater or lesser extent and was replaced by a granulation, fibrous or fatty tissue that sometimes filled the bone marrow spaces.

The cells of granulation tissue were observed mainly in intermediate and deep CO zones and consisted mainly of capillaries, fibroblasts, histiocytes, lymphocytes and individual multinucleated cells. In the central sections of such infiltrates degenerative changes in the basic substance were noted, and that substance was surrounded by connective tissue fibers. When coloring the sections sensu van Gieson, the sclerotically altered areas were painted red (fig. 7) and were focally positive in the process of the PAS-reaction.

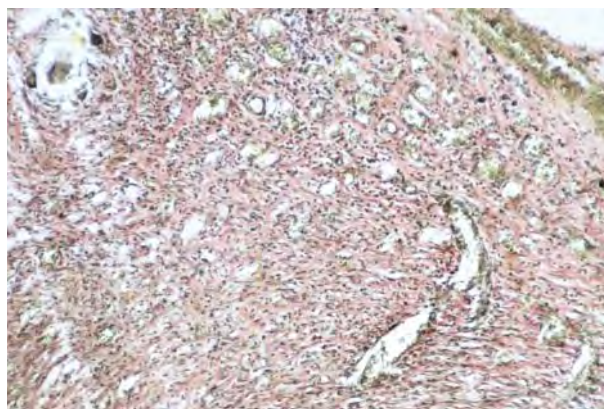


Figure 7 – Granulation tissue with a large number of capillaries and perivascular proliferation of fibrous fibers, single multinucleated cells. AA without treatment. 28th day. Painted sensu van Gieson, $\times 100$

When using the histochemical method sensu van Gieson, the collagen fibers and the walls of the vessels acquired a brighter red color. Schick test of collagen beams was uneven. The cartilage cells were of different sizes – from small ones with wrinkled core to large ones with light, swollen nuclei. In some chondrocytes the nuclei did not appear, because they were wrinkled and arranged in the form of crescents under the capsule of the joint.

Unlike untreated AA in rats treated with ibuprofen and ibuprofen with vinboron, no granulation tissue appeared during this study period (28 days).

In the AA group treated with ibuprofen in deep SM, a significant amount of fibrous connective tissue with proliferating fibroblast foci was recorded. The attention was also paid to the focal changes in blood vessels, mainly of the arterial type, in which thickening of the intima was noted due to proliferation of the endothelium, homogenization of the muscular layer and perivascular sclerosis.

The morphometric analysis of the cellular composition of inflammatory CO infiltrates in rats with AA without treatment established statistically significant ($p \leq 0.05$) prevalence of lymphocytes, epithelioid cells of plasmocytes and macrophages over other cellular elements. So, the number of lymphocytes was increased by $232.5 \pm 40.8\%$ (6086.0 ± 674.5 , 95% CI: 4763.7–7407.4 units), epithelioid cells by 14.3 [7.1–105.4] % (800 [800–1400] units), plasmocytes by $271.5 \pm 97.1\%$ (986.0 ± 82.9 , 95% CI: 823.3–1148.2 units), macrophages by $255.7 \pm 55.7\%$ (1228.6 ± 60.6 , 95% CI: 1109.9–1347.4 units) in comparison with the intact rats on the 28th day of the experiment, indicating chronicity and immune character of inflammation (Fig. 8 A, B, C, K).

Along with lymphocytic and macrophage infiltration, a significant ($p \leq 0.05$) increase in the number of tissue basophils ($+ 150.0$ [123.8–237.1] %) and fibroblasts ($+ 63.2$ [40.0–88, 3] %) in the stroma of SM – 350.0 [300.0–425.0] units and 2100.0 [1525.0–2200.0] units respectively, in comparison with the indices of animals of other groups (see Fig. 8 D, F). Most of the tissue basophils were in an active state, as evidenced by their degranulation, which was well manifested around the vessels of the stroma of SM when staining the main brown (Fig. 9).

As we can see in Figure 8, the significant proliferation of fibroblasts was observed in SM, and their number increased according to the morphometric data in all the groups.

In the group of rats with AA, treated with ibuprofen, next to the sites of articular cartilage degeneration, there were always unchanged areas usually free of synovial pannus. The lympho-histiocytic infiltrates did not go beyond the periarticular connective tissue.

In experimental animals with AA who were administered ibuprofen on the 28th day, moderate inflammation was noted in the periarticular connective tissue, sometimes with the formation of epithelioid and giant cell granulomas, circulatory disorders, stasis in the vessels of the microcirculatory bed with insignificant perivascular edema. The surface defects of the cartilaginous tissue were noted in 10.0% of animals treated with ibuprofen and practically did not appear in the group of combined use of ibuprofen and vinboron. The skin had an ordinary

histological structure in 80.0% of experimental animals treated with ibuprofen and 90.0% of rats treated with ibuprofen and vinboron.

Microscopically in the rats of the monotherapy ibuprofen group and the group of combined use of ibuprofen and vinboron, pannus formation also took place. However, the intensity of fibrillogenesis was significantly less than in untreated AA, which was confirmed by morphometric examination data (see Fig. 8), sometimes there were small areas where connective tissue tightly fused with cartilaginous.

Occasionally, the small cell-length areas and areas with very narrow cartilage were identified, where chondrocytes were located only in 2–3 rows. Unlike untreated AA, acidic and sulfated glycosaminoglycans were not detected when the preparations of alcian blue were painted in connective tissue, however, their number increased in the cartilaginous tissue, which was confirmed by a positive reaction when using the main brown (Fig. 10, 11).

In rats treated with ibuprofen in combination with vinboron, the collagen fibers of fibrous periarticular tissue were joined into thick beams and homogenized. Foci of lympho-plasmocyte infiltration were rarely recorded. The most common infiltrates were from fibro- and histiocytic cells. Compared with the group of untreated AA and AA treated with ibuprofen, less expressed degenerative-dystrophic and atrophic changes were observed in the cartilage. In the basal parts of the cartilage there was an increase in sclerosis of the intercellular substance and cell death. Basal parts of the cartilage and subchondral plate often remained undisturbed and there was practically no growth of vessels in the cartilage from the side of the bone marrow cavities.

In experimental animals with AA who received ibuprofen in combination with vinboron, on the 28th day of the experiment a statistically significant decrease ($p \leq 0.05$) of the number of lymphoid elements was found to be $63.6 \pm 3.3\%$ (95% CI: 57.2–70.1%) with respect to the indices of rats with AA without treatment and it was 2128.6 ± 198.5 (95 % CI: 1736.6–5185.0) units, which was only 19.8 % higher than that of intact rats (1971.4 ± 280.9 (95 % CI: 1420.9–2522.0) units).

The reduction in the intensity of inflammatory infiltration of CO was also recorded when assessing the density of other inflammatory elements (see Fig. 8). Tissue basophils, like neutrophilic leukocytes, were rare, mostly around the vessels, which may indicate a decrease in the synthesis and release of inflammatory mediators (serotonin, histamine) from tissue basophils.

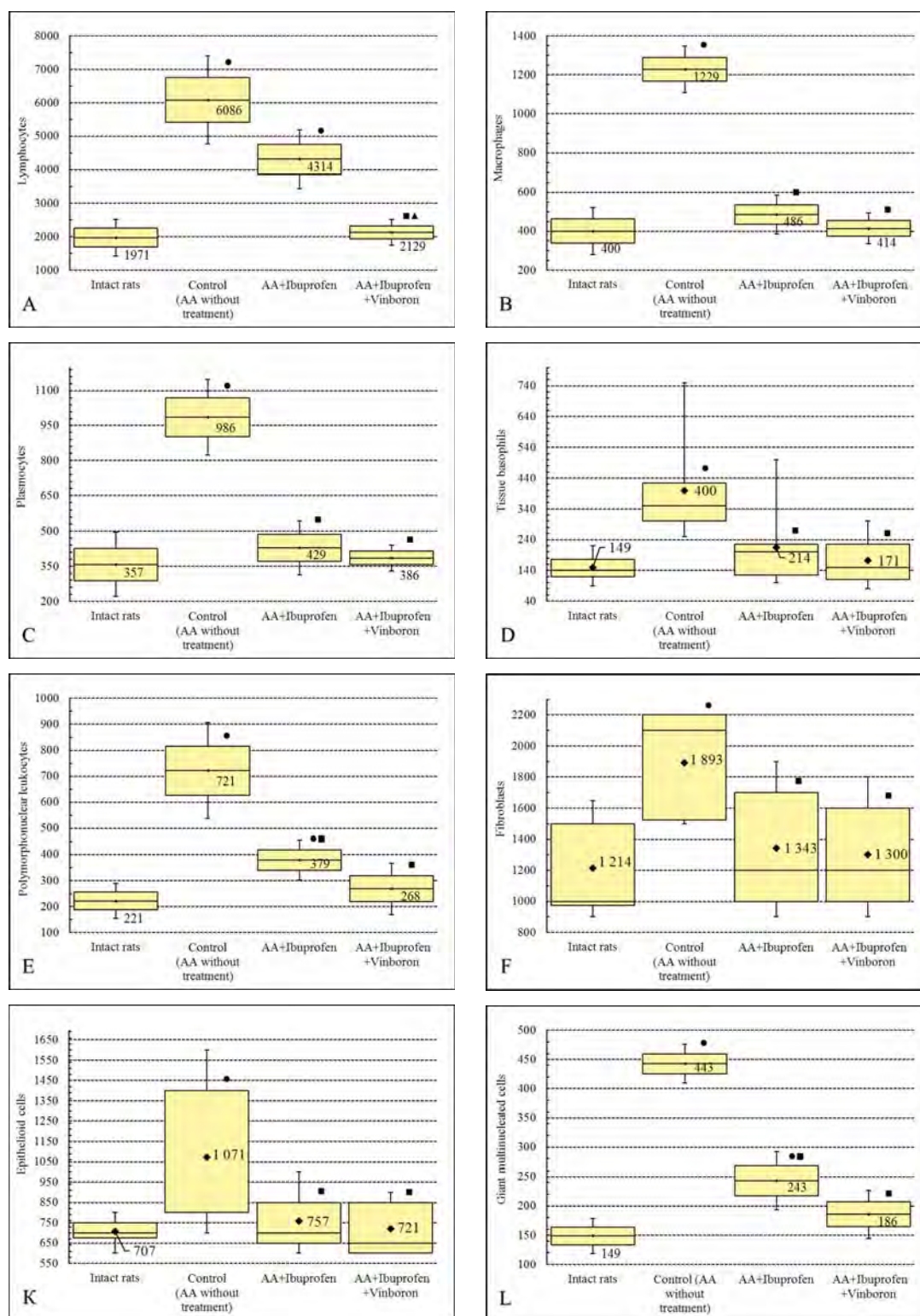


Figure 8 – Density of the cellular elements of the synovial membrane of the ankle joint of rats (per 1 mm²) with adjuvant arthritis on the 28th day of the experiment

Notes:

- – $p \leq 0,05$ relatively intact animals;
- – $p \leq 0,05$ relatively controlled animals;
- ▲ – $p \leq 0,05$ with respect to the monotherapy group ibuprofen;

to Fig. 8: A, B, C, E, L – the distribution of the values of each group of the sample population is normal. The boxes include the value of the standard error of the arithmetic meaning, vertical lines outside the boxes denote 95% confidence interval. The horizontal line and the number inside the box are arithmetic meanings;

to Fig. 8 D, F, K, L – the distribution of the quantities is abnormal. The boxes include the results from the 25th to 75th percentiles. The vertical lines outside the boxes are the minimum and maximum values. The horizontal line inside the box is a median, the figures indicate the arithmetic meanings.

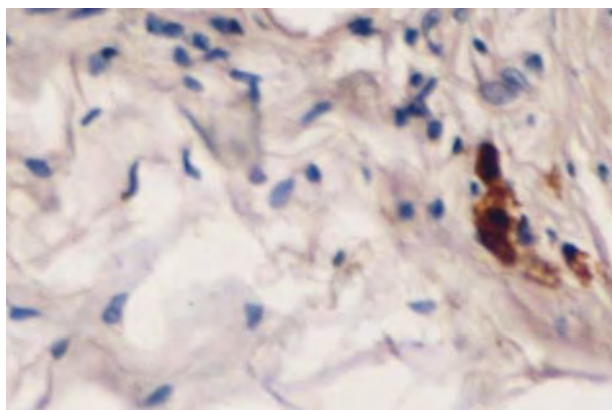


Figure 9 – Tissue basophils in a state of degranulation around the vessels of the stroma of SM. AA without treatment, 28 days. Basic brown, $\times 400$

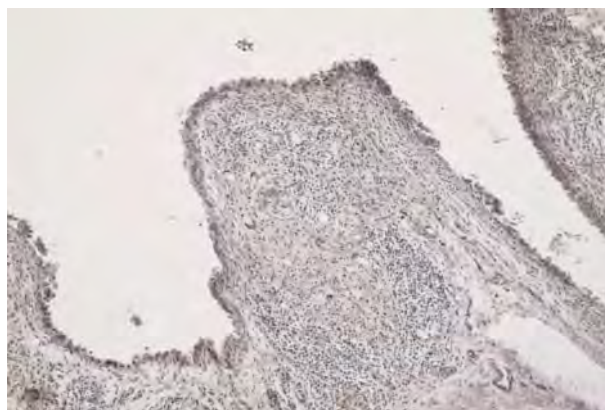


Figure 10 – Minor lymphocytic infiltration of synovial villi with stromal fibrosis and a small number of glycosaminoglycans. AA, treated with ibuprofen. The 28th day. Basic brown, $\times 200$

The carried out radiation study showed that on the 28th day of the experiment, hyperextended of proximal phalanges with flexion in proximal interphalangeal joints and extension in distal interphalangeal joints were observed in AA rats without treatment, which caused the formation of classical rheumatic lesions – a hammer-shaped deformation of II–V toes (Fig. 12).

According to the CBCT (Cone Beam Computed Tomography), subcutaneous inoculation of CFA resulted in an increase in the volume of all joints of the hindlimbs by almost a half (+ 90.1%) relative to the indices of intact rats. The greatest increase in volume was noted in I and V sprouts-metatarsal joints by 142.6% ($p < 0.001$) and 162.0 % ($p < 0.01$), respectively, relative to the values of intact animals. Among the metatarsophalangeal joints, the volumes of I and V metatarsophalangeal joints increased by 130.6 % ($p < 0.005$) and 133.5 % ($p < 0.001$), respectively, relative to the indices of intact animals. The smallest changes in the volume of the hind limb joints in rats were noted in the interphalangeal joints, and the average increase in volume was 52.7 % relative to the calculated joint volume of healthy animals (Tab. 1).

Against the background of the combined use of ibuprofen and vinboron, we observed the greatest slowdown

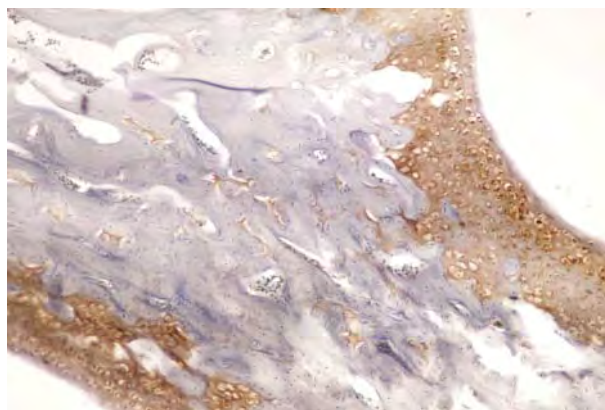


Figure 11 – Increase in the number of acidic and sulfated glycosaminoglycans in chondrocytes. AA, treated with ibuprofen and vinboron. The 28th day. Basic brown, $\times 100$

in the progression of the inflammatory process. This was indicated by a decrease in the volume of the joints against the background of combined treatment of rats with AA on average by 33.8 % relative to the animals in the control group.



Figure 12 – Roentgenograms of the hind limbs of rats with adjuvant arthritis without treatment on the 28th day of the experiment in a direct projection.

Table 1 – Correlation of the volume of small joints (mm³) and width of articular slots (mm) of the hind limbs of rats with adjuvant arthritis against the background of ibuprofen and its combination with vinboron according to cone-ray computerized tomography
($M \pm m$ or Me [IQR: LQ; UQ], $n = 7$)

No. in order	The experimental conditions Name of joint	I group Intact rats		II group Adjuvant arthritis without treatment (control)		III group Adjuvant arthritis + Ibuprofen (218 mg/kg, i.g.)		IV group Adjuvant arthritis + Ibuprofen (218 mg/kg, i.g.) + Vinboron (11 mg/kg, i.g.)	
		Volume of the joint, mm ³	Width of the joint space, mm	Volume of the joint, mm ³	Width of the joint space, mm	Volume of the joint, mm ³	Width of the joint space, mm	Volume of the joint, mm ³	Width of the joint space, mm
1	The first metatarsophalangeal joint (art. metatarsophalangeae I)	3.00 [2.83; 3.92]	0.4 [0.4; 0.5]	6.92 [5.83; 7.38] $p_1 < 0.005$ (+130.6 %)	0 [0; 0.05] $p_1 < 0.005$	6.23 [5.81; 6.73] $p_1 < 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-10.0 %)	0.2 [0.15; 0.20] $p_1 < 0.01$ $p_2 < 0.05$	3.86 [2.92; 4.45] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-44.3 %) $p_3 > 0.05$	0.3 [0.25; 0.30] $p_1 < 0.05$ (-25%) $p_2 < 0.05$ $p_3 < 0.05$
		$q = 0.16$; $p = 0.7$		$q = 0.25$; $p = 0.6$		$q = 0.61$; $p = 0.13$		$q = -0.16$; $p = 0.7$	
2	The second metatarsophalangeal joint (art. metatarsophalangeae II)	5.38 [4.71; 5.81]	0.5 [0.4; 0.5]	9.12 [7.78; 9.96] $p_1 < 0.005$ (+69.4 %)	0 [0; 0.05] $p_1 < 0.005$	5.89 [4.82; 6.64] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-35.5 %)	0.2 [0.20; 0.25] $p_1 < 0.005$ (-60%) $p_2 < 0.05$	5.38 [4.83; 6.10] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-41.0 %) $p_3 > 0.05$	0.3 [0.2; 0.3] $p_1 < 0.005$ (-40%) $p_2 > 0.05$ $p_3 > 0.05$
		$q = -0.78$; $p = 0.04$		$q = -0.04$; $p = 0.9$		$q = -0.16$; $p = 0.7$		$q = -0.12$; $p = 0.8$	
3	The third metatarsophalangeal joint (art. metatarsophalangeae III)	4.22 [3.64; 5.61]	0.4 [0.30; 0.45]	8.74 [6.60; 9.94] $p_1 < 0.05$ (+107.1 %)	0.2 [0.20; 0.25] $p_1 < 0.05$ (-50.0%)	5.65 [4.77; 5.78] $p_1 > 0.05$ $p_2 < 0.05$ (-35.3 %)	0.4 [0.3; 0.4] $p_1 > 0.05$ $p_2 < 0.05$	4.42 [3.86; 4.71] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (49.4 %) $p_3 > 0.05$	0.4 [0.35; 0.40] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ $p_3 > 0.05$
		$q = 0.98$; $p < 0.001$		$q = -0.4$; $p = 0.37$		$q = -0.41$; $p = 0.36$		$q = 0.79$; $p = 0.03$	
4	The fourth metatarsophalangeal joint (art. metatarsophalangeae IV)	4.83 [4.64; 5.22]	0.5 [0.35; 0.50]	8.36 [6.72; 9.14] $p_1 < 0.05$ (+73.0 %)	0.2 [0.2; 0.3] $p_1 < 0.05$ (-60%)	5.02 [4.45; 8.76] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-39.9 %)	0.3 [0.3; 0.4] $p_1 > 0.05$ (-40%) $p_2 > 0.05$ (+50%)	4.99 [4.43; 6.13] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-40.3 %) $p_3 > 0.05$	0.4 [0.3; 0.4] $p_1 > 0.05$ (-20%) $p_2 < 0.05$ (+100%) $p_3 > 0.05$
		$q = 0.48$; $p = 0.28$		$q = -0.60$; $p = 0.15$		$q = -0.24$; $p = 0.6$		$q = 0.58$; $p = 0.17$	

Table 1 continued

5	The fifth metatarsophalangeal joint (<i>art. metatarsophalangeae V</i>)	3.51 ± 0.38	0.4 [0.4; 0.4]	8.20 ± 0.57 $p_1 < 0.001$ (+133.5 %)	0.2 [0.20; 0.25] $p_1 < 0.005$ (- 50%)	4.44 ± 0.56 $p_1 > 0.05$ $p_2 < 0.001$ (-45.8 %)	0.3 [0.30; 0.35] $p_1 < 0.05$ $p_2 < 0.05$	4.05 ± 0.47 $p_1 > 0.05$ $p_2 < 0.001$ (-50.6 %) $p_3 > 0.05$	0.3 [0.3; 0.3] $p_1 < 0.01$ $p_2 > 0.05$ $p_3 > 0.05$
6	Proximal interphalangeal joint of the first toe (<i>art. interphalangeae proximalis I</i>)	1.96 ± 0.21	0.3 [0.25; 0.30]	2.88 ± 0.53 $p_1 > 0.05$ (+46.4 %)	0 [0; 0.2] $p_1 < 0.05$	1.93 ± 0.22 $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-33.0 %)	0.3 [0.2; 0.3] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$	1.69 ± 0.24 $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-41.1 %) $p_3 > 0.05$	0.3 [0.3; 0.3] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ $p_3 > 0.05$
7	Proximal interphalangeal joint of the second toe (<i>art. interphalangeae proximalis II</i>)	2.35 ± 0.19	0.3 [0.30; 0.45]	3.04 ± 0.50 $p_1 > 0.05$ (+29.5 %)	0.1 [0; 0.3] $p_1 < 0.05$ (- 67%)	2.86 ± 0.28 $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-6.1 %)	0.3 [0.1; 0.3] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$	2.62 ± 0.39 $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-13.9 %) $p_3 > 0.05$	0.2 [0.2; 0.3] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ $p_3 > 0.05$
8	Proximal interphalangeal joint of the third toe (<i>art. interphalangeae proximalis III</i>)	2.09 ± 0.12	0.3 [0.3; 0.4]	3.30 ± 0.39 $p_1 < 0.05$ (+58.1 %)	0.2 [0.1; 0.2] $p_1 < 0.05$ (- 33%)	2.49 ± 0.25 $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-24.6 %)	0.3 [0.3; 0.3] $p_1 > 0.05$ $p_2 < 0.05$	2.27 ± 0.42 $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-31.1 %) $p_3 > 0.05$	0.3 [0.25; 0.30] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ $p_3 > 0.05$
9	Proximal interphalangeal joint of the fourth toe (<i>art. interphalangeae proximalis IV</i>)	1.98 ± 0.09	0.4 [0.4; 0.4]	3.13 ± 0.29 $p_1 < 0.005$ (+51.5 %)	0.1 [0; 0.2] $p_1 < 0.005$ (- 75%)	3.04 ± 0.55 $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-18.3 %)	0.3 [0.15; 0.30] $p_1 < 0.005$ $p_2 > 0.05$	2.45 ± 0.37 $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-33.7 %) $p_3 > 0.05$	0.3 [0.30; 0.35] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ $p_3 > 0.05$
10	Proximal interphalangeal joint of the fifth toe (<i>art. interphalangeae proximalis V</i>)	1.46 ± 0.22	0.3 [0.3; 0.3]	2.50 ± 0.12 $p_1 < 0.005$ (+77.8 %)	0.2 [0.15; 0.20] $p_1 > 0.05$ (- 33%)	2.17 ± 0.24 $p_1 < 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-17.6 %)	0.2 [0.15; 0.25] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$	1.92 ± 0.34 $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (-25.6 %) $p_3 > 0.05$	0.3 [0.2; 0.3] $p_1 > 0.05$ $p_2 > 0.05$ (+ 50%) $p_3 > 0.05$

Notes: p_1 – the level of statistical significance with respect to intact animals; p_2 – the level of statistical significance relative to control animals;
 p_3 – the level of statistical significance with respect to the group of monotherapies with ibuprofen

Characterizing the state of the articular fissures of the hind limbs in rats, it should be noted that the development of AA resulted in a significant decrease in the width of the joint cracks by an average of 58.8 % relative to the values of intact animals. This is consistent with the literature data on changes in the structural organization of joints in rheumatoid arthritis [2, 36-37]. It is worth noting that in I and II metatarsophalangeal joints and the proximal interphalangeal joint of the 1st toe, we found a complete ankylosis, and in III – V metatarsophalangeal joints the width of the joint gap did not exceed 0.2 mm, which was more than twice lower than the indices of intact animals (see Tab. 1).

Against the backdrop of monotherapy with ibuprofen, an increase in the width of the articular gap of all joints was noted, but against the background of the combined use of ibuprofen and vinboron, we observed a more pronounced increase in the width of the joint gaps, which could be practically compared with the indices of intact animals, which indicates the ability of vinboron to enhance the anti-inflammatory properties of ibuprofen.

In intact rats between the joint volume and the width of the joint gaps of the hind limbs, a moderate correlation was observed ($p = 0.373 \pm 0.10$; 95% CI: 0.17–0.57). The development of AA in rats resulted in a decrease ($p > 0.05$) in the value of the Spearman coefficient (p) by 23.0% relative to the indices of intact rats and it was 0.282 ± 0.05 , respectively; 95% CI: 0.19–0.38, which indicates a decrease in the correlation force (CF) between the studied parameters. Monotherapy with AA ibuprofen resulted in a slight increase in CF ($p = 0.295 \pm 0.04$, 95% CI: 0.21–0.38). The combined use of ibuprofen and vinboron resulted in the restoration ($p > 0.05$) of SCS between the joint volume and the width of the joint gaps ($p = 0.365 \pm 0.09$, 95% CI: 0.20–0.53), indicating harmonization of the anti-inflammatory action of ibuprofen in its joint application with the spasmolytic of Ukrainian production, which

Conclusion. The carried out study showed that in experimental animals with untreated AA on the 28th day of the experiment, pathological changes were registered predominantly in the capsule of the joints with a char-

acteristic fibrocystic transformation of the periarticular connective tissue, the formation of pannus in the cartilaginous surface of the joints. The pathomorphological feature of untreated AA, along with the formation of pannus, diffuse lymph-histiocytic infiltration and destruction of bone tissue, was also the detection of granulation tissue at the time of our observation, indicating a chronic nature of the inflammatory response and a violation of the regenerative properties of the synovial epithelium.

The use of ibuprofen in combination with vinboron was accompanied by restoration of the structure and function of the cartilage and bone tissue, and it was evidenced by the appearance of acidic and sulfated glycosaminoglycans.

The restoration of bone tissue was realized by the proliferation of connective tissue and its transformation into cartilage. SM was hyperplastic with proliferating synoviocytes of both macrophage and secretory types. Only in rare cases the phenomena of moderate edema and insignificant focal lymph-histiocytic infiltration persisted. Thus, the use of ibuprofen in combination with vinboron in AA rats resulted in a reduction or absence of inflammation in both the joint and periarticular tissues.

The analysis of the results of cone-ray computerized tomography and digital radiography showed that against the background of simultaneous administration of ibuprofen and vinboron there was a tendency to increase the anti-inflammatory effect of the studied antiphlogistics on the rats' joints affected by adjuvant arthritis. On the 28-th day of the experiment there was the indication of decrease of the volume of the hind limb joints by an average of 33.8% compared to the control animals and a near-complete restoration of the width of the joint gaps of the joints examined. It was also determined that vinboron can harmonize the anti-inflammatory effect of ibuprofen when they are used together.

Acknowledgments. The authors expresses gratitude for the help in carrying out X – ray studies to the assistants of the Department of Radiology and Radiation Medicine of the Ivano-Frankivsk National Medical University Pogrebennyk Yaroslava & Yurkevych Bohdan.

Библиографический список

1. Мазуров В.И. Клиническая ревматология. Руководство для врачей. СПб.: издат. «Фолиант», 2005. 496 с.
2. Насонов Е.Л., Насонова В.А. Ревматология. Национальное руководство. М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2008. 737 с.
3. Раскина Т.А. Летаева М.В., Королева М.В. Профиль побочных эффектов нестероидных противовоспалительных препаратов при ревматических заболеваниях // Современная ревматология. 2011. № 4. С. 53–57. DOI: 10.14412/1996-7012-2011-699
4. Штрыголь С.Ю. Фармакологические свойства и проблемы безопасности применения НПВП – селективных и специфических ингибиторов циклооксигеназы-2 // Провизор. 2005. № 2. С. 37–42.
5. Shih A.R., Misdraji J. Drug-induced pathology of the upper gastrointestinal tract // Diagnostic Histopathology. 2017. No. 23 (2). P. 84–95. DOI: 10.1016/j.mpdhp.2017.03.002
6. Blackler R.W., Gemici B., Manko A., Wallace J.L. NSAID-gastroenteropathy: new aspects of pathogenesis and prevention // Curr. Opin. Pharmacol. 2014. No. 11. P. 11–16. DOI: 10.1016/j.coph.2014.05.008
7. Masso Gonzalez E.L., Pastrignani P., Tacconelli S., Garcia Rodriguez L.A. Variability among nonsteroidal antiinflammatory drugs in risk of upper gastrointestinal bleeding // Arthritis Rheum. 2010. No. 62(6). P. 1592–1601. DOI: 10.1002/art.27412
8. Lanás A, Garcia-Rodriguez L.A., Arroyo M.T., Gomollon F., Feu F., Gonzalez-Perez A., Zapata E., Bastida G., Rodrigo L., Santolaria S., Guell M., de Argila C.M., Quintero E., Borda F., Pique J.M. Risk of upper gastrointestinal

- ulcer bleeding associated with selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors, traditional non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin and combinations // Gut. 2006. No. 55. P. 1731–1738.
9. Евсеев М.А. Повреждение кишечной трубки нестероидными противовоспалительными препаратами: клиническое значение, патогенез, возможности профилактики // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2013. № 1. С. 79–87. DOI: 10.14412/2074-2711-2013-2405
 10. Гладких Ф.В., Степанюк Н.Г. Сучасні шляхи послаблення ультроерогенності нестероїдних протизапальних засобів: досягнення, невідомі питання та шляхи оптимізації // Запорозький медичний журнал. 2014. № 2(83). С. 82–86. DOI: 10.14739/2310-1210.2014.2.25437
 11. Гладких Ф.В. Характеристика механізмів антиультроерогенного дії агоністів ванілоїдних рецепторів (TRPV1) на моделі гастропатії, індукованої ацетилсаліциловою кислотою // Фармація і фармакологія. 2017. № 5 (3). С. 283–301. DOI: 10.19163/2307-9266-2017-5-3-283-301
 12. Гладких Ф.В., Степанюк Н.Г. Характеристика протизапальної та знеболюючої активності ібупрофену та його комбінації з вінбороном на моделі ад'ювантного артриту у щурів // Вісник наукових досліджень. 2015. № 2 (79). С. 108–111. DOI: 10.11603/2415-8798.2015.2.5617
 13. Гладких Ф.В., Степанюк Н.Г., Степанюк Г.І., Сокирко М.В. Патент України на корисну модель № UA 107533 U МПК A61K 31/135 (2006.01). Застосування вінборону для потенціювання антифлогістичного ефекту ібупрофену / Заявник та патентовласник Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова. № у 2015 12613; заявл. 21.12.2015; опубл. 10.06.2016, Бюл. № 11.
 14. Гладких Ф.В., Степанюк Н.Г., Студент В.О., Погребенник Я.Я., Юркевич Б.Є. Оцінка ефективності лікування експериментального ревматоїдного артриту ібупрофеном та його комбінацією з вінбороном за даними конусно-променевої комп'ютерної томографії та цифрової рентгенографії задніх кінцівок щурів // Фармакологія та лікарська токсикологія. 2017. № 1 (52). С. 12–24.
 15. Черноіван Н.Г., Волощук Н.І., Бухтіарова Т.А., Шаламай А.С., Курилюк А.С. Вплив вінборону на величину протизапальної та знеболюючої дії диклофенаку при ад'ювантному артриті // Фармакологія та лікарська токсикологія. 2008. № 1–3. С. 57–59.
 16. Гладких Ф.В., Човган І.С., Студент В.О., Полозов С.Д., Юркевич Б.Є. Оцінка ефективності протизапальної терапії експериментального ревматоїдного артриту ібупрофеном та його комбінацією з вінбороном за показниками ремоделювання кісткової тканини // Матеріали XIV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку–2017» (26–28 квітня 2017 р.): тези доп. Вінниця. 2017. С. 509.
 17. Pearson C.M., Wood F.D. Studies of polyarthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant. I. General clinical and pathological characteristics and some modifying factors // Arthr. and Rheum. 1959. No. 2. P. 440–459. DOI: 10.1002/1529-0131(195910)2:5<440::AID-ART1780020510>3.0.CO;2-N
 18. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації. К.: ВД «Авіцена», 2001. 527 с.
 19. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Москва. 2005. С. 695–709.
 20. Freund J. Some aspects of active immunization // Annual Review of Microbiology. 1947. No. 1. P. 291–308.
 21. Newbould B.B. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant // Br. J. Pharmacol. Chemother. 1963. No. 21 (1). P. 127–136.
 22. Саратиков А.С., Венгеровский А.И., Прищеп Т.П. Адьювантная болезнь (морфология, патогенез, экспериментальная терапия): монография. Томск : Издат. Томского университета. 1983. 101 с.
 23. Snehalatha U., Anburajan M., Venkatraman B., Menaka M. Evaluation of complete Freund's adjuvant-induced arthritis in a Wistar rat model. Comparison of thermography and histopathology // Zeitschrift fur Rheumatologie. 2013. No. 72 (4). P. 375–382. DOI: 10.1007/s00393-012-1083-8
 24. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Доклады АН СССР. 1979. Т. 247. № 6. С. 1513–1516.
 25. Rainsford K.D. Ibuprofen: pharmacology, therapeutics and side effects: monograph. Heidelberg: Springer Basel, 2012. 259 p.
 26. Гладких Ф.В., Степанюк Н.Г. Вінборон: перший український гастропротектор – агоніст ванілоїдних рецепторів (TRPV1) // Фармакологія та лікарська токсикологія. 2016. № 4–5 (50). С. 20–29.
 27. Гринев А.Н., Панищев Е.К., Столярчук А.А., Иванова Н.И., Пискун Р.П. Новый лекарственный препарат феникаберан // Химико-фармацевтический журнал. 1979. № 11. С. 118–121.
 28. Чекман І.С., Столярчук О.О., Гайовий В.П. Експериментально-клінічна характеристика препарату «Фенікаберан» // Фармац. журн. 1992. № 5–6. С. 76–78.
 29. Автандилов Г.Г. Основы патологоанатомической практики. Руководство (издание третье дополненное). М.: Российская медицинская академия последипломного образования. 2007. 480 с.
 30. Голофеевский В.Ю., Щербак С.Г. Сочетанная окраска гистологических срезов основным коричневым и прочным зеленым // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1987. № 4. С. 101.
 31. Сапожников А.Г., Доросевич А.Е. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство. Смоленск: САУ, 2000. 476 с.
 32. Шубич М.Г. Метод элективной окраски кислых (сульфатированных) мукополисахаридов основным коричневым // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1961. № 2. С. 116–120.
 33. Багрий М.М., Діброва В.А., Попадинець О.Г., Гришук М.І. Методики морфологічних досліджень: монографія. Вінниця: Нова книга. 2016. 328 с.
 34. Aurell Y., Malac M., Forslind K. Work in progress: cone beam computed tomography (CBCT or extremity CT) – a new tool for evaluation of erosions in patients with rheumatoid arthritis // European Society of Musculoskeletal

- Radiology. 2014. DOI: 10.1594/essr2014/P-0028
35. Al-Ekrish A.A., Ekram M. A comparative study of the accuracy and reliability of multidetector computed tomography and cone beam computed tomography in the assessment of dental implant site dimension // *Dentomaxillofacial Radiology*. 2011. No. 40. P. 67–75. DOI: 10.1259/dmfr/27546065
 36. Раскина Т.А., Ушаков А.В. Оценка состояния костной ткани методом компьютерной томографии у больных ревматоидным артритом // *Науч.-практ. ревматология*. 2002. № 1. С. 20–22.
 37. Реуцкий И.А., Маринин В.Ф., Глотов А.В. Диагностика ревматических заболеваний. Руководство для врачей. М.: ООО «Мед. информ. агентство». 2011. С. 260–287.
 38. Van der Heijde D.M. Radiographic imaging: «gold standard» for assessment of disease progression in rheumatoid arthritis // *Rheumatology*. 2000. Vol. 39. P. 9–16. DOI: 10.1038/35046102
 39. Гладких Ф.В., Степанюк Н.Г., Студент В.О., Степанюк Г.И., Сокирко М.В. Патент України на корисну модель № UA 117538 U МПК (2017.01), A61K 31/135 (2006.01), A61P 29/00 Спосіб оцінки протизапальної активності фармакологічних речовин за величиною об'єму дрібних суглобів задніх кінцівок у щурів на моделі ревматоїдного артриту / Заявник та патентовласник Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова. № у 2017 01095; заявл. 06.02.2017; опубл. 26.06.2017, Бюл. №12.
 40. Резников О.Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // *Ендокринологія*. 2003. Т. 8. № 1. С. 142–145.
 41. Zar J.H. Biostatistical analysis (5 ed.). Prentice-Hall, Englewood. 2014.

References

1. Mazurov VI. Klinicheskaya revmatologiya. Rukovodstvo dlya vrachej [Clinical rheumatology. Guide for doctors]. SPb.: publ. "Foliant". 2005. 496 p. Russian.
2. Nasonov EL, Nason VA. Revmatologiya Nacionalnoe rukovodstvo [Rheumatology. National leadership]. Moscow: GEOTAR-Media. 2008. 737 p. Russian.
3. Raskin TA, Letaeva MV, Koroleva MV. Profil pobochnyh effektov nesteroidnyh protivovospalitelnyh preparatov pri revmaticheskikh zabolevaniyah [A profile of the side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in rheumatic diseases]. *Modern rheumatology journal*. 2011;4:53–7. DOI: 10.14412/1996-7012-2011-699. Russian.
4. Strygol SYu. Farmakologicheskie svoystva i problemy bezopasnosti primeneniya NPVP selektivnyh i specificheskikh inhibitorov ciklooksigenazy-2 [Pharmacological properties and safety problems of NSAID use – selective and specific inhibitors of cyclooxygenase-2]. *Provizor*. 2005;2:37–42. Russian.
5. Shih AR, Misdraji J. Drug-induced pathology of the upper gastrointestinal tract. *Diagnostic Histopathology*. 2017;23(2):84–95. DOI: 10.1016/j.mpdhp.2017.03.002
6. Blackler RW, Gemici B, Manko A, Wallace JL. NSAID-gastroenteropathy: new aspects of pathogenesis and prevention. *Curr. Opin. Pharmacol*. 2014;11:11–6. DOI: 10.1016/j.coph.2014.05.008
7. Masso Gonzalez EL, Pastrignani P, Tacconelli S, Garcia Rodriguez LA. Variability among nonsteroidal anti-inflammatory drugs in risk of upper gastrointestinal bleeding. *Arthritis Rheum*. 2010;62(6):1592–601. DOI: 10.1002/art.27412
8. Lanás A, Garcia-Rodriguez LA, Arroyo MT, Gomollon F, Feu F, Gonzalez-Perez A, Zapata E, Bastida G, Rodrigo L, Santolaria S, Guell M, de Argila CM, Quintero E, Borda F, Pique JM. Risk of upper gastrointestinal ulcer bleeding associated with selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors, traditional non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin and combinations. *Gut*. 2006;55:1731–38.
9. Evseev MA. Povrezhdenie kishechnoy trubki nesteroidnymi protivovospalitelnyimi preparatami klinicheskoe znachenie patogeneza vozmozhnosti profilaktiki [Damage to the intestinal tube by non-steroidal anti-inflammatory drugs: clinical significance, pathogenesis, prevention possibilities]. *Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics*. 2013;1:79–87. DOI: 10.14412/2074-2711-2013-2405. Russian.
10. Hladkykh FV, Stepanyuk NG. Suchasni shlyahi poslablennya ulcerogennosti nesteroidnih protizapalnih zasobiv: dosyagnennya nevirishen pitannya ta shlyahi optimizatsii [New approaches to reduce ulcerogenicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: achievements, unsolved issues and ways to optimize]. *Zaporozhskij medicinskij zhurnal*. 2014;2(83):82–6. DOI: https://doi.org/10.14739/2310-1210.2014.2.25437. Ukrainian.
11. Hladkykh FV. Harakteristika mekhanizmov antiulcerogennogo dejstviya agonistov vaniloidnyh receptorov TRPV1 na modeli gastropatii inducirovanoj acetylsalicilovoy kislotoj [Characteristics of the mechanisms of anti-ulcerogenic action of vanilloid receptor agonists (TRPV1) on the model of gastroepathy induced by acetylsalicylic acid]. *Pharmacy & Pharmacology*. 2017;5(3):283–301. DOI: 10.19163/2307-9266-2017-5-3-283-301. Russian.
12. Hladkykh FV, Stepanyuk NG. Harakteristika protizapalnoi ta zneboluyuchoi aktivnosti ibuprofenu ta jogo kombinatsii z vinboronom na modeli adyuvantnogo artritu u shchuriv [Characterization of anti-inflammatory and analgesic activity of ibuprofen and its combination with vinoboron on the model of adjuvant arthritis in rats]. *Bulletin of scientific research*. 2015;2(79):108–11. DOI: 10.11603/2415-8798.2015.2.5617. Ukrainian.
13. Hladkykh FV, Stepanyuk NG, Stepanyuk GI, Sokirko MV. Patent of Ukraine to the utility model No. UA 107533 U MPK A61K 31/135 (2006.01). Zastosuvannya vinboronu dlya potenciyuvannya antiflogistichnogo efektu ibuprofenu [Application of vinoboron for potentiating the antiflogistic effect of ibuprofen]. Applicant and patent holder Vinnytsia National Medical University. No. u. 2015 12613; stated. 12.2.2015; has published Jun 10, 2011, Bul. No. 11. Ukrainian.
14. Hladkykh FV, Stepanyuk NG., Student VO., Pogrebennik YYa., Yurkevich BYe. Ocinka efektyvnosti likuvannya eksperimentalnogo revmatoidnogo artritu ibuprofenom ta jogo kombinatsiyu z vinboronom za danimi konusno-promenevoi kompyuternoi tomografii ta cifrovio rentgenografii zadnih kincivok shchuriv [Estimation of the

- effectiveness of treatment of experimental rheumatoid arthritis with ibuprofen and its combination with vinoboron according to the data of cone-ray computer tomography and digital X-ray of the hind limbs of rats]. Pharmacology and drug toxicology. 2017;1(52):12–24. Ukrainian.
15. Chernoyvan NG, Voloshchuk NI, Bukhtiarova TA, Shalamay AS, Kurilyuk AC. Vpliv vinboronu na velichinu protizapalnoi ta zneboluyuchoi dii diklofenaku pri adyuvantnomu artriti [Effect of vinoboron on the amount of anti-inflammatory and analgesic activity of diclofenac in adjuvant arthritis]. Pharmacology and drug toxicology. 2008; 1–3:57–9. Ukrainian.
 16. Hladkykh FV, Chovgan IS, Student VO, Polozov SD, Yurkevich BYe. Ocinka effektivnosti protizapalnoi terapii eksperimentalnogo revmatoidnogo artritu ibuprofenom ta jogo kombinaciyu z vinboronom za pokaznikami remodelyuvannya kistkovoi tkanini [Evaluation of the effectiveness of anti-inflammatory therapy of experimental rheumatoid arthritis ibuprofen and its combination with vinoboron on bone remodeling indicators]. Materials of the XIV International Scientific Conference of Students and Young Scientists “The First Step in Science-2017” (April 26–28, 2017): theses of additional. Vinnitsa. 2017:509. Ukrainian.
 17. Pearson CM, Wood FD. Studies of polyarthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant. I. General clinical and pathological characteristics and some modifying factors. Arthr. and Rheum. 1959;2:440–59. DOI: 10.1002/1529-0131(195910)2:5<440::AID-ART1780020510>3.0.CO;2-N
 18. Stefanov OV. Doklinichni doslidzhennya likarskih zasobiv: metod. rekomend. [Preclinical research of medicinal products: method. recommend] K.: VD “Avicena”. 2001. 527 p. Ukrainian.
 19. Khubriev RU. Rukovodstvo po eksperimentalnomu doklinicheskomu izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv [Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances]. Moscow. 2005:695–709. Russian.
 20. Freund J. Some aspects of active immunization. Annual Review of Microbiology. 1947;1:291–308.
 21. Newbould B.B. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. Br. J. Pharmacol. Chemother. 1963;21(1):127–36.
 22. Saratikov AS, Wengerovsky AI, Prischept TP. Adyuvantnaya bolezn (morfologiya, patogeneza, eksperimentalnaya terapiya): monografiya [Adjuvant disease (morphology, pathogenesis, experimental therapy): monograph]. Tomsk: Izdat. Tomsk University. 1983. 101 p. Russian.
 23. Snehalatha U, Anburajan M, Venkatraman B, Menaka M. Evaluation of complete Freund’s adjuvant-induced arthritis in a Wistar rat model. Comparison of thermography and histopathology. Zeitschrift fur Rheumatologie. 2013; 72(4):375–82. DOI: 10.1007/s00393-012-1083-8
 24. Rybolovlev YuR, Rybolovlev RS. Dozirovanie veshchestv dlya mlekopitayushchih po konstantam biologicheskoy aktivnosti [Dosage of substances for mammals according to the constants of biological activity]. Reports of the Academy of Sciences of the USSR. 1979; 247(6):1513–6. Russian.
 25. Rainsford KD. Ibuprofen: pharmacology, therapeutics and side effects: monograph. Heidelberg: Springer Basel. 2012. 259 p.
 26. Hladkykh FV, Stepanyuk NG. Vinboron pershij ukrainskij gastroprotektor agonist vaniloidnih receptoriv (TRPV1) [Vinboron: The first Ukrainian gastroprotector – hvanilloid receptor agonist (TRPV1)]. Pharmacology and drug toxicology. 2016; 4–5(50):20–9. Ukrainian.
 27. Grinev AN, Panishev EK, Stolyarchuk AA, Ivanova NI, Piskun RP. Novyj lekarstvennyj preparat fenikaberan [New medicinal product of fenicaberan]. Pharmaceutical Chemistry Journal. 1979;11:118–21. Russian.
 28. Chekman IS, Stolyarchuk OO, Gayoviy VP. Eksperimentalno-klinichna charakteristika preparatu Fenikaberan [Experimental-clinic characteristics of the drug “Fenikaberan”]. Farmaceuticheskij zhurnal. 1992;5–6:76–8. Ukrainian.
 29. Avtandilov GG. Osnovy patologoanatomicheskoy praktiki. Rukovodstvo (izdanie trete dopolnennoe) [Fundamentals of pathoanatomical practice. Manual (third edition augmented)]. M: Russian Medical Academy of Postgraduate Education. 2007. 480 p. Russian.
 30. Golofeevsky VYu, Shcherbak SG. Sochetannaya okraska gistologicheskikh srezov osnovnym korichnevym i prochnym zelenym [Combined color of histological sections of the main brown and durable green]. Arhiv anatomii gistologii i embriologii. 1987;4:101. Russian.
 31. Sapozhnikov AG, Dorosevich AE. Gistologicheskaya i mikroskopicheskaya tekhnika: Rukovodstvo [Histology and microscopy technique: Manual]. Smolensk: SAU. 2000. 476 p. Russian.
 32. Shubich MG. Metod elektivnoy okraski kislykh sulfatirovannykh mukopolisaharidov osnovnym korichnevym [Method of elective coloring of acid (sulfated) mucopolysaccharides by the main brown]. Bulletin of experimental biology and medicine. 1961; 2:116–20. Russian.
 33. Bagriy MM, Dibrova VA, Popadinets OG, Grischuk MI. Metodiki morfologichnih doslidzen: monografiya [Methods of morphological doslands: monograph]. Vinnytsya: Nova kniga. 2016. 328 p. Ukrainian.
 34. Aurell Y, Malac M, Forslind K. Work in progress: cone beam computerized tomography (CBCT or extremity CT) – a new tool for evaluation of erosions in patients with rheumatoid arthritis. European Society of Musculoskeletal Radiology. 2014. DOI: 10.1594/essr2014/P-0028
 35. Al-Ekrish AA, Ekram MA. A comparative study of the accuracy and reliability of multidetector computerized tomography and cone-beam computerized tomography in the assessment of dental implant site dimension. Dentomaxillofacial Radiology. 2011; 40:67–75. DOI: 10.1259/dmfr/27546065
 36. Raskin TA, Ushakov AV. Ocenka sostoyaniya kostnoj tkani metodom kompyuternoy tomografii u bolnykh revmatoidnym artritom [Evaluation of bone tissue by the method of computerized tomography in patients with rheumatoid arthritis]. Rheumatology Science and Practice. 2002;1:20–2. Russian.

37. Reutsky IA, Marinin VF, Glotov AV. Diagnostika revmaticheskikh zabolevanij Rukovodstvo dlya vrachej [Diagnosis of rheumatic diseases. Manual for doctors]. M.: OOO "Med. inform. agenstvo". 2011:260-87. Russian.
38. Van der Heijde D.M. Radiographic imaging: "gold standard" for assessment of disease progression in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2000;39:9–16. DOI: 10.1038/35046102
39. Hladkykh FV, Stepanyuk NG, Student VO, Stepanyuk GI, Sokirko MV. Patent of Ukraine for Utility Model No. UA 117538 U MPK (2017.01), A61K 31/135 (2006.01 A61P 29/00 Sposib ocinki protizapalnoi aktivnosti farmakologichnih rechovin za velichinoyu ob mu dribnih suglobiv zadnih kincivok u shchuriv na modeli revmatoidnogo artritu [A method for evaluating the anti-inflammatory activity of pharmacologic substances by the size of the volume of small joints of the hind limbs in rats on the model of rheumatoid arthritis]. Applicant and patent holder Vinnitsa National Medical University. No. 2017 01095; stated. 02/06/2017; Published 26/06/2017, Byul. No. 12. Ukrainian.
40. Reznikov OG. Zagalni etichni principi eksperimentiv na tvarinah [General ethical principles of experiments on animals]. *Endocrinology*. 2003;8(1):142–5. Ukrainian.
41. Zar JH. Biostatistical analysis (5 ed.). Prentice-Hall, Englewood. 2014.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы:

Гладких Фёдор Владимирович – врач неотложной медицины отделения экстренной (неотложной) медицинской помощи коммунального предприятия «Казатинская центральная районная больница Казатинского районного Совета», член Всеукраинской общественной организации «Ассоциация фармакологов Украины». Область научных интересов: поиск и изучение новых подходов к улучшению профиля безопасности и повышению эффективности нестероидных противовоспалительных препаратов, изучение механизмов антиульцерогенного действия препаратов с гастропротективной активностью, в частности агонистов TRPV₁; скрининг химических соединений, пригодных для создания фармакокорректоров воспалительных и ишемических процессов; исследование способов повышения биодоступности фармакологических средств; изучение влияния наночастиц на фармакокинетику и фармакодинамику лекарственных препаратов и физиологически активных веществ. Google Scholar: scholar.google.com.ua/citations?hl=ru&user=Odxj7QgAAAAJ ORCID: orcid.org/0000-0001-7924-4048 Researcher ID: researcherid.com/rid/M-5709-2017 ПИИЦ: elibrary.ru/author_profile.asp?id=936072 SPIN-код ПИИЦ: 2126-1563 Researchgate: researchgate.net/profile/Fedir_Hladkykh НБУВ: irbis-nbuv.gov.ua/ASUA/1261931 E-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Студент Владимир Емельянович – аспирант, ассистент кафедры нормальной физиологии Львовского национального медицинского университета имени Данила Галицкого; врач – челюстно-лицевой радиолог Львовского Центра медицинской 3D диагностики. Область научных интересов: методологическая стандартизация конусно-лучевой компьютерной томографии в клинике челюстно-лицевой патологии, применение наномангнетиков в аппаратной визуализации; оптимизация процессов конъюгации наночастиц с лекарственными препаратами, изучение взаимодействия газотропных и метаболитных факторов в механизмах цитопротекции тонкого кишечника при использовании ферритиновых наночастиц с разным типом покрытия. Researchgate: researchgate.net/profile/Student_Volodymyr E-mail: student.volodymyr@gmail.com; 3dlviv@gmail.com

Степанюк Наталья Георгиевна – доктор меди-

Authors:

Hladkykh Fedir Volodymyrovych – doctor of emergency medicine of the Emergency Medical Aid Department of the Kazatin Central District Hospital of the Kazatinsky District Council., a member of the All-Ukrainian Public Organization "Association of Pharmacologists of Ukraine". Research interests: search and study of new approaches to improving the safety profile and increasing the effectiveness of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, studying the mechanisms of anti-ulcer action of drugs with gastroprotective activity, in particular of TRPV₁ agonists; screening of chemical compounds suitable for creating pharmacological correctors of inflammatory and ischemic processes; studying the ways to increase the bioavailability of pharmacological agents; studying the effect of nanoparticles on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs and physiologically active substances. Google Scholar: scholar.google.com.ua/citations?hl=ru&user=Odxj7QgAAAAJ ORCID: orcid.org/0000-0001-7924-4048 Researcher ID: researcherid.com/rid/M-5709-2017 ПИИЦ: elibrary.ru/author_profile.asp?id=936072 SPIN-код ПИИЦ: 2126-1563 Researchgate: researchgate.net/profile/Fedir_Hladkykh НБУВ: irbis-nbuv.gov.ua/ASUA/1261931 E-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Student Volodymyr Omelianovych – post-graduate student, assistant of the Department of Normal Physiology of Danil Galitsky Lviv National Medical University; doctor-maxillofacial radiologist of Lviv Medical Diagnostics Center. Research interests: methodological standardization of cone-ray computerized tomography in the clinic of maxillofacial pathology, application of nanomagnetics in hardware imaging; optimization of the processes of conjugation of nanoparticles with drugs, the study of the interaction of gasotropic and metabotropic factors in mechanisms of cytoprotection of the small intestine using ferritin nanoparticles with different types of coating. Researchgate: researchgate.net/profile/Student_Volodymyr E-mail: student.volodymyr@gmail.com; 3dlviv@gmail.com

Stepaniuk Natalia Heorgievna – Doctor of Sciences

цинских наук, доцент кафедры клинической фарма-
ции, фармакотерапии и медицинской стандартизации
Львовского национального медицинского универси-
тета имени Данила Галицкого; член Государствен-
ного экспертного центра Министерства здравоохра-
нения Украины по вопросам побочного действия
лекарственных средств по Львовскому региону; член
Всеукраинской общественной организации «Ассоциа-
ция фармакологов Украины». Область научных инте-
ресов: изучение влияния препаратов с политропными
фармакологическими свойствами на фармакокинети-
ку и фармакодинамику нестероидных противовоспа-
лительных препаратов; разработка и доклиническое
изучение эффективности НПВП нового поколения
«Диклокор» – комбинация диклофенака с кверцети-
ном. E-mail: natali.stepanuyk@gmail.com

Вернигородский Сергей Викторович – доктор
медицинских наук, профессор кафедры патологи-
ческой анатомии, судебной медицины и права Вин-
ницкого национального медицинского университета
им. Н.И. Пирогова. Область научных интересов: из-
учение морфогенеза метаплазии слизистой оболочки
желудка при предраковых состояниях; патоморфо-
логическая характеристика хронического атрофиче-
ского метапластического гастрита. Google Scholar:
scholar.google.com.ua/citations?user=rCmVqsgAAAAJ
Researchgate: researchgate.net/profile/Sergii_Vernygorodskyi
E-mail: medservervit@gmail.com

(Medicine), associate professor of the Department of
Clinical Pharmacy, Pharmacotherapy and Medical
Standardization of the Danil Galitsky Lviv National
Medical University; Member of the State Expert Center
of the Ministry of Health of Ukraine on the side effects
of drugs in the Lviv region; member of the All-Ukrainian
public organization “Association of Pharmacologists
of Ukraine”. Research interests: study of the effect
of drugs with polytropic pharmacological properties
on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of
nonsteroidal anti-inflammatory drugs; development
and preclinical study of the effectiveness of the new
generation of NSAIDs “Diclocor” – a combination of
diclofenac with quercetin. E-mail: natali.stepanuyk@
gmail.com

Vernyhorodskyi Serhyi Viktorovych – Doctor of
Sciences (Medicine), Professor of the Department of
Pathological Anatomy, Forensic Medicine and Law of
Vinnytsia National Pirogov Memorial Medical Universi-
ty. Research interests: the study of the morphogenesis of
metaplasia of the gastric mucosa in precancerous states;
pathomorphological characteristics of chronic atrophic
metaplastic gastritis. Google Scholar: scholar.google.
com.ua/citations?user=rCmVqsgAAAAJ Research-
gate: researchgate.net/profile/Sergii_Vernygorodskyi
E-mail: medservervit@gmail.com

Поступила в редакцию: 05.08.2017
Принята к печати: 25.09.2017

Received: 05.08.2017
Accepted for publication: 25.09.2017

УДК 616.12-008.331.1:536.912

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ МОДЕЛИРОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С АКТИВНЫМ ЦЕНТРОМ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

А.А. Глушко¹, А.С. Чиряпкин¹, В.С. Чиряпкин¹,
А.М. Муртузалиева¹, Ю.А. Полковникова²

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,
357532, Россия, Пятигорск, пр. Калинина, 11
E-mail: alexander.glushko@lcmmp.ru

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Воронежский государственный университет», 394036, Россия, г. Воронеж, ул. Студенческая, 3
E-mail: juli-polk@mail.ru

Заболевания сердечно-сосудистой системы – главная причина смертности среди населения по всему миру. Разработка новых препаратов, позволяющих нормализовать артериальное давление, является перспективным направлением в области фармации и медицины. Сейчас широкое распространение для лечения артериальной гипертензии и хронической сердечной недостаточности нашли ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ). Главный механизм ингибиторов АПФ заключается в блокировании превращения ангиотензина I в ангиотензин II, что опосредует расширение сосудов. **Целью** данной работы является подбор методики моделирования взаимодействия лизиноприла с активным центром ангиотензинпревращающего фермента с использованием метода молекулярной динамики. **Материалы и методы.** В качестве лиганда была использована молекула лизиноприла, заряды атомов которой были рассчитаны методом теории функционала плотности (ТФП) $ub3lyp$ с базисными наборами 6-31G* и 6-311G**. Моделирование 75 нс молекулярной динамики взаимодействия лизиноприла с активным центром АПФ проводилось в программе Биоэврика. В результате моделирования молекулярной динамики была получена траектория системы «лизиноприл-АПФ». После этого было произведено сравнение конформаций лиганда в различные моменты времени моделирования с экспериментальной конформацией по величине среднеквадратического отклонения координат атомов. **Результаты и обсуждение.** Результаты моделирования показали, что лизиноприл с зарядами, соответствующими базисному набору 6-311G**, ведет себя в активном центре АПФ в соответствии с данными рентгеноструктурного анализа, в отличие от лизиноприла с зарядами, рассчитанными базисным набором 6-31G*. **Заключение.** Была разработана методика моделирования молекулярной динамики взаимодействия лизиноприла с активным центром ангиотензин-конвертирующего фермента. Полученная методика может быть использована для изучения взаимодействия веществ, сходных по структуре с лизиноприлом с активным центром АПФ.

Ключевые слова: ангиотензинпревращающий фермент, активный центр, лизиноприл, ингибитор, молекулярная динамика, заряд, базисный набор

Для цитирования:

Глушко А.А., Чиряпкин А.С., Чиряпкин В.С.,
Муртузалиева А.М., Полковникова Ю.А.
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ МОДЕЛИРОВАНИЯ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ С АКТИВНЫМ ЦЕНТРОМ
АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА.
Фармация и фармакология. 2017;5(5):487-503.
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-487-503
© Глушко А.А., Чиряпкин А.С., Чиряпкин В.С.,
Муртузалиева А.М., Полковникова Ю.А., 2017

For citation:

Glushko A.A., Chiriapkin A.S., Chiriapkin V.S.,
Murtuzaliev A.M., Polkovnikova Yu.A.
DEVELOPMENT OF METHODS OF SIMULATION
OF THE INTERACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE
SUBSTANCES WITH THE ACTIVE CENTER OF
ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME. (In Russ.)
Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(5):487-503.
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-487-503

DEVELOPMENT OF METHODS OF SIMULATION OF THE INTERACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES WITH THE ACTIVE CENTER OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME

A.A. Glushko¹, A.S. Chiriapkin¹, V.S. Chiriapkin¹,
A.M. Murtuzaliev¹, Yu.A. Polkovnikova²

¹Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University,
11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532
E-mail: alexander.glushko@lcmmp.ru

²Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Voronezh State University",
3, Student Street, Voronezh, Russia, 394036
E-mail: juli-polk@mail.ru

Nowadays cardiovascular diseases are the main cause of death among the population around the world. The development of new drugs, giving a possibility to normalize blood pressure, is a promising direction in the field of pharmacy and medicine. Now inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) are widely adopted for the treatment of hypertension and chronic heart failure. The principle of action of ACE inhibitors is based on blocking the conversion of angiotensin I into angiotensin II, which mediates vasodilation. **The aim of the work** is a selection of methods of lisinopril interaction with the active center of angiotensin-converting enzyme by molecular dynamics methods. **Materials and methods.** Lisinopril molecule was used as a ligand; the charges of that ligand were calculated with the density functional theory (DFT) and ub3lyp method with the basis sets 6-31G* and 6-311G**. Simulation of 75 ns of molecular dynamics of lisinopril interaction with the active center of ACE was carried out in the Bioevrica program. As a result of molecular dynamics simulation, the trajectory of the "lisinopril-ACE" system was obtained. After that a comparison of ligand conformations at different points in simulation time with the experimental conformation of the value of standard deviation of coordinates of atoms was made. **Results and discussion.** The results of simulation have showed that lisinopril with the charges corresponding to basis set 6-311G** behaves consistent with the x-ray data in the active center of the ACE, in contrast to lisinopril with the charges calculated by basis set 6-31G*. **Conclusion.** The methods of lisinopril interaction modeling with the active center of angiotensin-converting enzyme has been selected. The obtained technique can be used for studying the interaction of substances, similar in structure to lisinopril with the active center of the enzyme (ACE).

Keywords: angiotensin-converting enzyme (ACE), active site, lisinopril, inhibitor, molecular dynamics, charge, basis set

Введение. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) – группа химических соединений, применяемых непосредственно для лечения гипертонической болезни и хронической сердечной недостаточности. Принцип действия ингибиторов АПФ основан на блокировании превращения ангиотензина I в ангиотензин II, что опосредует расширение сосудов. При этом также снижается секреция альдостерона корой надпочечников и происходит увеличение концентрации брадикинина за счет уменьшения его инактивации АПФ. В свою очередь, брадикинин, взаимодействуя с B₂-кининовыми рецепторами сосудистого эндотелия, провоцирует высвобождение других вазодилатирующих факторов, вызывая ещё большее расслабление гладких мышц [1].

На современном этапе лечения гипертонической болезни ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента получили широкое применение. При их приеме нормализуется коронарное, почечное, мышечное и мозговое кровообращение, что является важным преимуществом данной группы препаратов. Ингибиторы АПФ понижают общее периферическое сосудистое сопротивление, пост- и преднагрузку на миокард, снижается частота возникновения аритмий,

улучшается работа сердца в фазу диастолы. Также наблюдается предупреждение развития гипертрофии левого желудочка, минимизируется вероятность и степень развития ишемии и фиброза миокарда. Предупреждается гипертрофия гладкомышечных стенок артерий [2].

В связи со скачками артериального давления и нарастающей внутрисердечной гипертензии происходит повреждение сосудов почек. Ингибиторы АПФ обеспечивают защиту почек при лечении гипертонической болезни. У больных с хронической формой почечной недостаточности отмечаются признаки улучшения работы почек при приеме ингибиторов АПФ при условии отсутствия резких скачков давления. В случае приема препаратов, увеличивающих диурез, помимо ингибиторов АПФ, возникает возможность надёжно контролировать уровень артериального давления на продолжительный период времени у больных гипертонической болезнью. Также ингибиторы АПФ воздействуют на продукцию и высвобождение альдостерона из надпочечников, что ведет к увеличению диуреза, повышению уровня калия и снижению уровня натрия в организме, нормализации водно-электролитного обмена [1].

У ингибиторов АПФ в спектре биологической активности присутствует антисклеротический эффект, который обуславливается торможением образования на поверхностях клеток эндотелия ангиотензина II, увеличение образование оксида азота – главного дилатирующего фактора сосудистых стенок. Также при приеме ингибиторов АПФ в крови повышается уровень липопротеинов высокой плотности и снижается уровень атерогенных фракций липидов [3].

Препараты, обладающие способностью ингибировать АПФ, оказывают влияние на углеводный обмен. Наблюдается повышение чувствительности тканей к инсулину, улучшается метаболизм глюкозы из-за нормализации тканевого кровообращения и повышения уровня брадикинина [4].

В середине 70-х годов 20 века был получен синтетическим путем новый ингибитор АПФ – лизиноприл, который является лизиновым производным эналаприла (другого ингибитора АПФ). У лизиноприла есть ряд особенностей, которые отличают его от подавляющего большинства ингибиторов АПФ. Лизиноприл не является пролекарством, это активное вещество; лизиноприл не метаболизируется в организме и выводится почками, поэтому его можно рекомендовать при болезнях печени. Также данное вещество в малой степени связывается с белками плазмы крови (5–10%), что делает лизиноприл совместимым в приеме с другими препаратами, вступающими в конкурентное взаимодействие с белками плазмы крови [5]. В связи с данными преимуществами лизиноприла он находит широкое применение в медицине, а поиск новых ингибиторов с такими свойствами расширит ассортимент препаратов для лечения гипертонической болезни.

Лизиноприл, как и другие ингибиторы АПФ, благодаря наличию особой химической структуры, способен взаимодействовать с ионом цинка и аминокислотами внутри активного центра АПФ, и, таким образом, уменьшать активность фермента, связанную с конвертированием ангиотензина I в биологически активный ангиотензин II. Учитывая сложность связи между химической структурой и сродством к активному центру АПФ, целесообразным представляется детальное изучение молекулярного механизма связывания новых ингибиторов с данным ферментом. Одним из широко используемых в настоящее время методов изучения механизма взаимодействия лиганда с активным центром фермента является молекулярное моделирование [6].

Молекулярное моделирование – это современный теоретический метод изучения молекулярных систем, широко применяемый при поиске новых биологически активных веществ и включающий в себя такие направления исследований, как сравнительный анализ молекулярного поля, использование молекулярных дескрипторов, молекулярный докинг и молекулярная динамика.

Сравнительный анализ молекулярного поля основан на подборе лиганда, способного взаимодейство-

вать с биологической мишенью, путем сопоставления в пространстве молекулярных полей, служащих фармакофорным признаком. Главный недостаток данного метода заключается в том, что он применим только для веществ со сходными структурами [7].

Использование молекулярных дескрипторов позволяет прогнозировать биологическую активность веществ с использованием характеризующих их свойств (дескрипторов). К достоинствам данного метода можно отнести возможность быстрого подбора большого количества веществ с предполагаемой активностью. Однако данный метод не позволяет достичь высокой достоверности [8].

Метод молекулярного докинга предназначен для определения энергетически выгодных ориентаций исследуемых молекул в центре связывания макромолекулы-мишени. Однако в данном методе существенно упрощены схемы расчета межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействий, что накладывает ограничения на конформационную подвижность элементов системы лиганд-мишень [9].

Более точным подходом является метод молекулярной динамики, позволяющий в большей мере учесть конформационную подвижность, но применение данного метода требует больше вычислительных ресурсов по сравнению с методом молекулярного докинга. Метод молекулярной динамики основан на моделировании движения атомов в исследуемой системе, при этом атомы перемещаются согласно основным законам механики с учетом Ван-дер-Ваальсовых и электростатических взаимодействий [10].

В настоящее время для моделирования методами молекулярной динамики становятся доступны системы размером до миллионов атомов, что делает данный метод применимым для прогнозирования биологической активности на уровне взаимодействия лиганд-мишень.

Цель работы. Подбор методики моделирования взаимодействия лизиноприла с активным центром ангиотензинпревращающего фермента с использованием метода молекулярной динамики.

Материалы и методы. Ангиотензинпревращающий фермент является Zn^{2+} -зависимой пептидазой. Данный фермент содержит два домена (N- и C-домены) в составе одной полипептидной цепи. При каждом домене имеется каталитически активный центр. C- и N-домены являются гомологичными (гомология около 60%), они разделены между собой мостиковой последовательностью [11]. Выделяют две формы АПФ: соматический и тестикулярный. Соматическая форма встречается во многих органах человека. Тестикулярная форма экспрессируется в семенниках. Эти два вида АПФ отличаются формой строения, у тестикулярного она сферическая, а у соматического – несферическая. Также существуют изоформы АПФ, представляющие собой однодоменные формы фермента: свободные C- и N-домены, образующиеся после разрушения связей между собой.

Структура N-домена образована 621 аминокислотами, которые формируют эллипсоидную форму домена. В середине глобулы имеется туннель, делящий белок на два субдомена. Внутри этой полости располагается активный центр N-домена. В сужении канала находится ион цинка активного центра. При этом происходит разделение канала активного центра на две части длиной 8 Å и 17 Å. Предполагается, что длина канала является лимитирующим фактором при связывании и гидролизе длинных пептидов [12].

С-домен имеет аналогичную эллипсоидную форму, как и N-домен. Размеры С-домена 72x57x48 Å. В центре белка проходит узкий канал длиной около 30

Å, он делит фермент на 2 субдомена. В этом туннеле находится активный центр фермента, включающий молекулу цинка, необходимую для катализа АПФ [13].

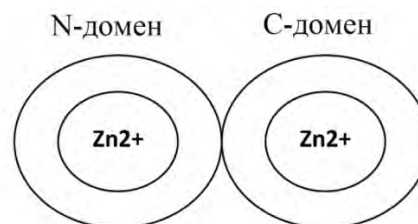


Рисунок 1 – Схематическая структура АПФ

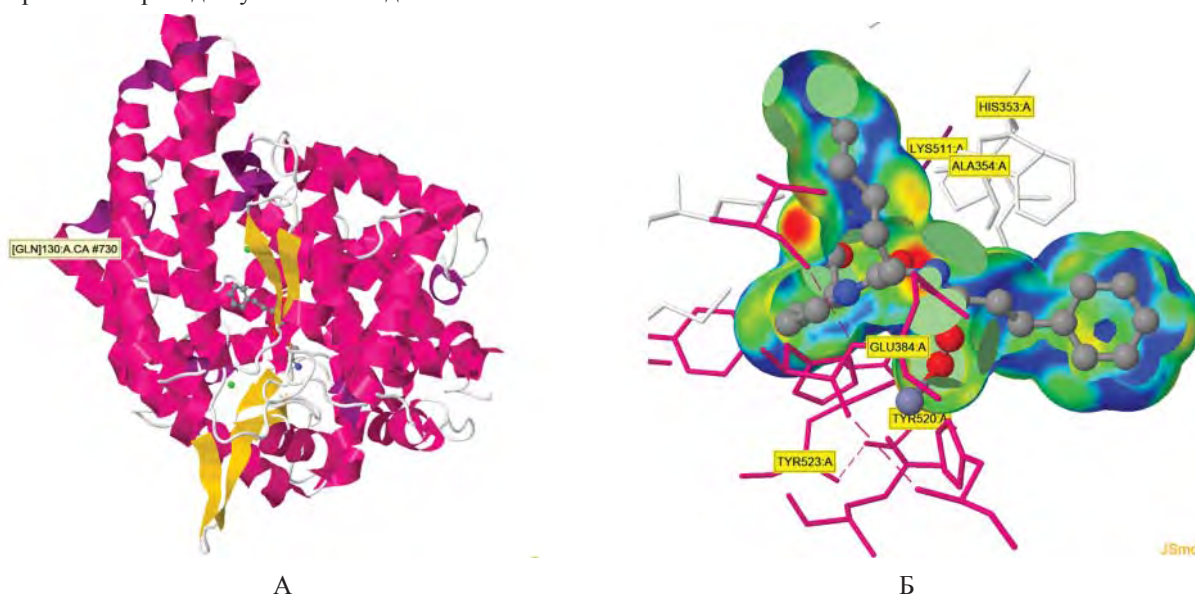


Рисунок 2 – Расположение лизиноприла в молекуле АПФ в активном центре N-концевого домена по данным рентгеноструктурного анализа (PDB: 1O86) (А – общий вид N-домена, Б – расположение молекулы лизиноприла в активном центре)

Для исследования взаимодействия низкомолекулярных соединений (лигандов) с активным центром ангиотензинпревращающего фермента нами использована пространственная структура комплекса белок-лиганд, представленная в базе данных rcsb.org (идентификационный код – 2x91) [14]. В данной модели содержится в качестве лиганда молекула лизиноприла, расположенная в активном центре АПФ.

Пространственная модель лизиноприла была построена в программе HyperChem 6.09. В этой же программе проведена оптимизация геометрии методом молекулярной механики ММ+ [15]. Далее проводилась оптимизация геометрии неограничен-

ным методом Хартри-Фока в базе 3-21G*. Для учета электростатического взаимодействия лиганда с сольватированным ферментом были рассчитаны заряды атомов лиганда методом теории функционала плотности (ТФП) ub3lyp (Unrestricted Becke, 3-parameter, Lee-Yang-Parr) [16] с базисными наборами 6-31G* и 6-311G** [17].

В программе Биоэврика [18, 19] было осуществлено моделирование взаимодействия лиганда с активным центром АПФ методом молекулярной динамики в силовом поле Amber94 [20]. Расчет потенциальной энергии в данном силовом поле производится в соответствии с формулой:

$$E_{\text{пот}} = \sum_i^{\text{связи}} K_i (r_i - r_{0,i})^2 + \sum_i^{\text{углы}} K'_i (\theta_i - \theta_{0,i})^2 + \sum_i^{\text{дв.углы}} \frac{V_i}{2} (1 + \cos(n_i \varphi_i - \varphi_{0,i})) + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i,j}^{\text{невалент.}} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \sum_{i,j}^{\text{невалент.}} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right],$$

где K_i – константа упругости связи, $\frac{\text{кДж}}{\text{моль} \cdot (\text{нм})^2}$; r_i – длина связи i , нм; $r_{0,i}$ – равновесная длина связи, нм; K'_i – константа упругости валентного угла, $\frac{\text{кДж}}{\text{моль} \cdot (\text{град})^2}$; θ_i – валентный угол, радиан; $\theta_{0,i}$ – равновесный угол

связи, радиан; V_i – константа двугранного угла, $\frac{\text{кДж}}{\text{моль}}$; φ_i – двугранный угол, радиан; $\varphi_{0,i}$ – равновесный двугранный угол, радиан; n_i – множитель (1, 2, 3, ..., i); r_{ij} – межатомное расстояние, нм; ϵ_0 – электрическая

постоянная, $\frac{\phi}{r}$; q_i и q_j – заряды ионов, Кл; σ_{ij} и σ_{ji} – константы потенциала Леннарда-Джонса.

Данная математическая модель эмпирически учитывает валентные, Ван-дер-Ваальсовы и электростатические взаимодействия в исследуемой системе, имея при этом низкую вычислительную сложность.

В дальнейшем было произведено добавление атомов водорода в соответствии с валентностями. После этого белок встраивался в водное окружение с помощью программы Gromacs (свободно распространяемая программа). Для учета влияния растворителя была использована модель воды TIP3P (*three point transferable intermolecular potentials*) [21]. Данная модель воды имеет жесткую геометрию из 3 атомов, расположенных под углом. Для учета электростатического взаимодействия у каждого атома имеется свой определенный заряд, но суммарный заряд молекулы воды равен нулю. Взаимодействие неполярных молекул описывается согласно парному потенциалу Леннарда-Джонса. Параметры для данного взаимодействия были получены путем воспроизведения энтальпии испарения и плотности жидкой воды при стандартной температуре [22]. Модель воды TIP3P получила широкое распространение в молекулярном моделировании, т.к. позволяет получить достаточно точные результаты при моделировании гидратированных белковых структур.

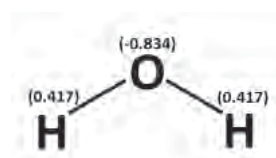


Рисунок 3 – Заряды атомов модели воды TIP3P

В качестве начальных условий лиганд был расположен в полости активного центра фермента.

Для оптимизации геометрии структуры был использован метод градиентного спуска. Градиент характеризует направление максимального возрастания функции с переменными (в данном случае роль переменных выполняют координаты атомов в пространстве). Таким образом, взяв антиградиент, можно найти направление наибольшего убывания. При оптимизации геометрии производится поиск минимума потенциальной энергии молекулярной системы, который соответствует энергетически наиболее выгодному положению атомов в пространстве.

На следующем этапе производилось моделирование молекулярной динамики исследуемой системы. Длительность моделирования молекулярной динамики составляла 75 нс, при этом использовался шаг интегрирования 1 фс. Термостатирование осуществлялось с использованием алгоритма Берендсена [23] с температурой до 310 К (табл. 1).

Таблица 1 – Температура моделирования

Время (фс)	Температура (К)
1	0
300000	10
500000	310

В результате моделирования молекулярной динамики была получена траектория системы «лизиноприл-АПФ». После этого было произведено сравнение конформаций лиганда в различные моменты времени моделирования с экспериментальной конформацией. Для этой цели была использована свободно распространяемая программа AutoDockTools [24]. В ней одновременно отображались два варианта расположения лизиноприла в активном центре АПФ – теоретический и экспериментальный (табл. 3).

Для количественной оценки отличия расположения молекулы лизиноприла в активном центре АПФ по результатам моделирования от расположения по данным рентгеноструктурного анализа была произведена оценка среднеквадратического отклонения

[25] лиганда относительно его экспериментальной конформации. Расчет среднеквадратического отклонения производился по формуле:

$$CKO = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N r_i^2}$$

где CKO – среднеквадратическое отклонение; N – количество атомов; r_i – расстояние между соответствующими атомами i , нм.

Результаты и обсуждение. Заряды атомов лизиноприла, рассчитанные методом теории функционала плотности *ub3lyp* с использованием двух базисных наборов 6-31G* и 6-311G** приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Заряды атомов молекулы лизиноприла вычисленные методом теории функционала плотности *ub3lyp* с использованием базисных наборов 6-31G* и 6-311G**

№	Атом	Заряды 6-31G*	Заряды 6-311G**	№	Атом	Заряды 6-31G*	Заряды 6-311G**
1	O	-0,534	-0,412	30	H	0,427	0,303
2	O	-0,589	-0,472	31	H	0,436	0,311
3	O	-0,601	-0,488	32	H	0,225	0,187
4	O	-0,586	-0,470	33	H	0,172	0,152
5	N	-0,624	-0,328	34	H	0,156	0,141
6	N	-0,434	-0,421	35	H	0,166	0,134
7	N	-0,718	-0,320	36	H	0,130	0,100
8	C	0,635	0,467	37	H	0,160	0,130
9	C	-0,122	-0,121	38	H	0,133	0,108
10	C	0,509	0,325	39	H	0,123	0,094
11	C	-0,016	-0,082	40	H	0,168	0,134
12	C	-0,007	-0,014	41	H	0,151	0,112
13	C	-0,294	-0,218	42	H	0,250	0,183
14	C	-0,304	-0,269	43	H	0,168	0,132
15	C	-0,130	-0,012	44	H	0,172	0,139
16	C	0,573	0,361	45	H	0,281	0,222
17	C	-0,166	-0,152	46	H	0,227	0,185
18	C	-0,102	-0,075	47	H	0,158	0,115
19	C	-0,351	-0,244	48	H	0,161	0,133
20	C	-0,248	-0,171	49	H	0,147	0,120
21	C	-0,287	-0,187	50	H	0,181	0,144
22	C	-0,359	-0,201	51	H	0,135	0,089
23	C	0,159	-0,114	52	H	0,125	0,082
24	C	-0,180	-0,052	53	H	0,116	0,077
25	C	-0,128	-0,088	54	H	0,120	0,079
26	C	-0,131	-0,085	55	H	0,135	0,085
27	C	-0,128	-0,088	56	H	0,381	0,264
28	C	-0,183	-0,054	57	H	0,427	0,302
29	H	0,385	0,277	58	O	-0,669	-0,549

В процессе моделирования молекулярной динамики в программе Биоэврика молекула лизиноприла была помещена в активный центр АПФ. По завершении моделирования был осуществлён экспорт траектории лизиноприла и проведено сравнение теоретической и экспериментальной конформаций в программе AutoDockTools. Конформации лизиноприла для зарядов атомов, рассчитанных с использованием базисных наборов 6-31G* и 6-311G**, приведены в таблице 3.

По результатам моделирования молекулярной динамики с зарядами, соответствующими базисному набору 6-31G*, лизиноприл теряет конформационную устойчивость в активном центре АПФ. С 70.0 нс моделирования молекулярной динамики АПФ лизиноприл теряет устойчивую связь с аминокислотой лизина Lys-495, находящуюся в активном центре АПФ. Две карбоксильные группы в данном случае

притягиваются к атому цинка, что не соответствует данным рентгеноструктурного анализа. При использовании зарядов атомов лизиноприла, соответствующих базисному набору 6-311G**, карбоксильная группа, расположенная у пептидной группы лизиноприла, связывается с ионом цинка, а другая карбоксильная группа лизиноприла, находящаяся в орто-положении от атома азота пирролидинового гетероцикла, связывается с аминокислотой лизина Lys-495. Такое расположение молекулы лизиноприла в активном центре АПФ, соответствующее данным рентгеноструктурного анализа, сохраняется после 70,0 нс моделирования молекулярной динамики АПФ.

Для полученных в результате моделирования молекулярной динамики конформаций лизиноприла, был произведен расчет среднеквадратического отклонения молекулы относительно экспериментальной конформации (табл. 4).

Таблица 3 – Расположение молекулы лизиноприла в активном центре АПФ по результатам моделирования молекулярной динамики (базисный набор 6-31G* и базисный набор 6-311G) в сравнении с экспериментальными данными (молекулярная динамика→, рентгеноструктурный анализ —→)**

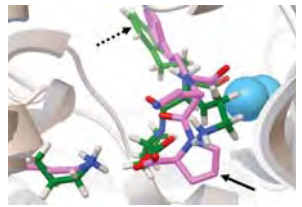
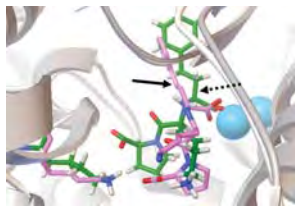
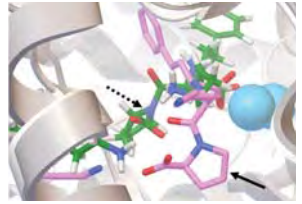
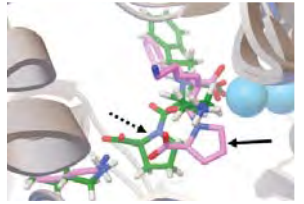
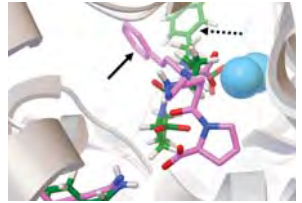
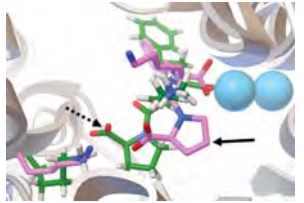
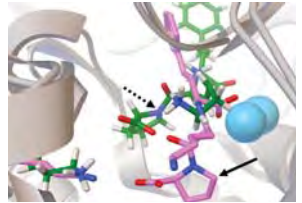
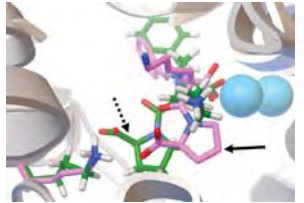
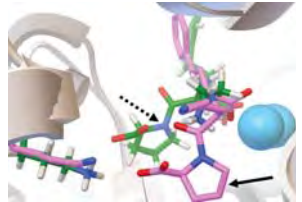
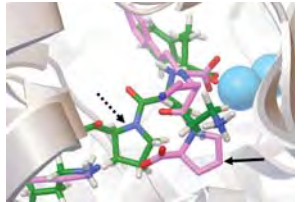
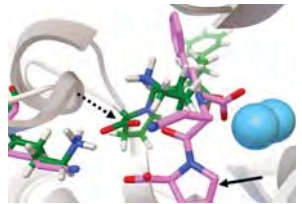
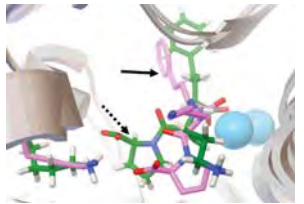
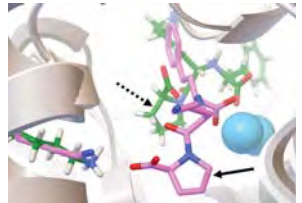
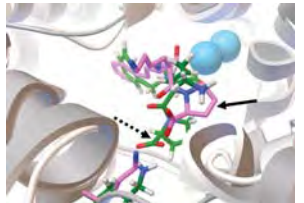
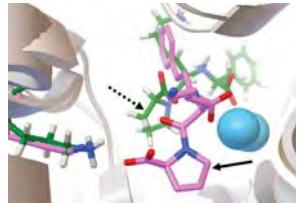
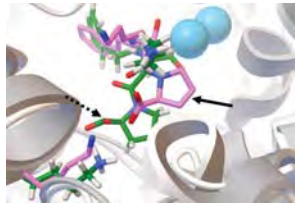
Время (нс)	Базисный набор 6-31G*	Базисный набор 6-311G**
10,5		
20,4		
30,3		
40,1		
50,0		
60,5		
70,0		
70,5		

Таблица 4 – Среднеквадратическое отклонение молекулы лизиноприла по результатам моделирования молекулярной динамики относительно экспериментальной конформации

Время (нс)	Среднеквадратическое отклонение, базисный набор 6-31G*, нм	Среднеквадратическое отклонение, базисный набор 6-311G**, нм
10,5	4,584	5,110
20,4	6,625	3,302
30,3	5,779	3,352
40,1	5,651	3,122
50,0	6,047	3,780
60,5	6,284	3,322
70,0	9,893	3,480
70,5	9,703	3,190

На рисунке 4 (табл. 4) видно, что среднеквадратическое отклонение для базисного набора 6-31G*, начиная с 70,0 нс моделирования молекулярной динамики, резко возрастает, в то время, как при

использовании базисного набора 6-311G** среднеквадратическое отклонение в течении всего времени моделирования колеблется в пределах десятых долей нм.

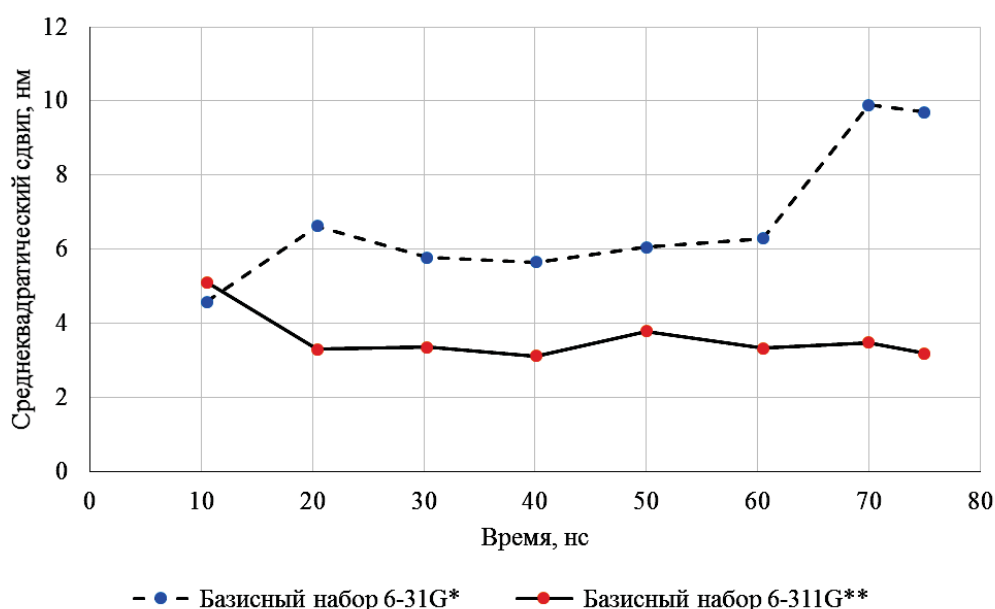


Рисунок 4 – Динамика изменения среднеквадратического отклонения молекулы лизиноприла по результатам моделирования молекулярной динамики относительно экспериментальной конформации

Результаты моделирования взаимодействия лизиноприла с активным центром АПФ с использованием зарядов атомов, рассчитанных в разных базисных наборах (базисный набор 6-31G* и базисный набор 6-311G**) оказались различны. Применение базисного набора 6-311G** для расчета зарядов атомов лиганда при моделировании молекулярной динамики связывания с активным центром АПФ позволяет достичь результатов близких к экспериментальным данным. При этом сохраняется расположение молекулы лизиноприла в активном центре АПФ соответствующее данным рентгеноструктурного анализа.

Вывод. Из результатов проведенного моделирования молекулярной динамики взаимодействия лизиноприла с активным центром АПФ можно сде-

лать вывод о том, что метод расчета зарядов атомов является важным параметром, который следует учитывать при исследовании взаимодействия веществ с активным центром АПФ. Предположительно базисный набор 6-311G** может быть использован в данной методике для расчета зарядов атомов молекул сходных по химической структуре с лизиноприлом и имеющих нулевой заряд.

По результатам проведенного исследования был подобран квантово-химический метод расчета зарядов атомов лиганда, а также метод и параметры моделирования молекулярной динамики, позволяющие добиться теоретического воспроизведения характеристик связывания молекулы лизиноприла методом молекулярной динамики в соответствии с данными рентгеноструктурного анализа.

Introduction. Inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE) are a group of chemical substances, used directly for treatment of hypertension and chronic heart failure. The principle of action of ACE inhibitors is based on blocking the conversion of angiotensin I into angiotensin II, which mediates vasodilation. This also reduces the secretion of aldosterone by adrenal cortex and increases concentration of bradykinin by decreasing its inactivation by the enzyme (ACE). Bradykinin, in its turn, interacting with B₂-kinin receptors in vascular endothelium, triggers the release of other vasodilating factors, causing even more relaxation of smooth muscles [1].

At the present stage of hypertension treatment angiotensin converting enzyme inhibitors are widely used. When they are taken, a coronary, renal, muscle and cerebral blood circulation becomes normal, which is an important advantage of this group of drugs. Angiotensin-converting-enzyme inhibitors decrease total peripheral vascular resistance, post - and preload on the myocardium, reduce the incidence of arrhythmias, improve a cardiac function in the diastolic phase.

Along with this, there is prevention of development of left ventricular hypertrophy, and minimization of probability degree of ischemia and fibrosis of the myocardium development. Hypertrophy of smooth muscles of arterial walls is also prevented [2]. Due to blood pressure jumps and increasing intra-cerebral hypertension the damage of blood vessels in kidneys takes place. ACE inhibitors protect kidneys in treatment of hypertension.

The signs of improvement in renal function are marked by patients with chronic renal failure while receiving ACE inhibitors in the absence of pressure jumps. While taking drugs increasing diuresis, in addition to ACE inhibitors, it becomes possible to reliably control the blood pressure level for a long period of time in patients with essential hypertension. ACE inhibitors also affect the production and release of aldosterone from the adrenal glands, causing the increase of urine output, the increase of the potassium level and the increase of the sodium level of the body, normalization of water-electrolyte metabolism [1].

ACE inhibitors have an antisclerotic effect in the spectrum of biological activity caused by the inhibition of the formation of angiotensin II on the surfaces of endothelial cells and the increase of nitric oxide formation, the main dilatation factor of vascular walls. While taking ACE inhibitors, the level of high density lipoprotein also increases in the blood and the level of atherogenic fractions of lipids decreases [3]. The substances having the ability to inhibit ACE also influence carbohydrate metabolism. There is an increase in the sensitivity of tissues to insulin, and the glucose metabolism improves as a result of normalization of tissue circulation and an increase of the bradykinin level [4].

In the middle of the 70s of the 20th century a new ACE inhibitor, lisinopril which is a lysine derivative of enalapril (another ACE inhibitor), was obtained synthetically. Lisinopril has a number of features that set it apart from the vast majority of ACE inhibitors. Lisinopril is not

a prodrug, it is the active substance; lisinopril is not metabolized in the body and excreted by kidneys, so it can be recommended in liver diseases. This substance is marginally associated with blood plasma proteins (5-10%), making lisinopril compatible with other drugs, coming into a competitive interaction with blood plasma proteins [5]. Caused by these benefits, lisinopril is widely used in medicine, and the search for new inhibitors with such properties will expand the range of drugs for hypertension treatment. Due to the presence of special chemical structures, Lisinopril, like other ACE inhibitors, is able to interact with zinc ion and amino acids within the active enzyme site, and thus reduces the activity of the enzyme, which is associated with the conversion of angiotensin I into biologically active angiotensin II.

Taking into consideration the complexity of the relationship between chemical structure and affinity to the active center of ACE, it seems appropriate to carry out a detailed study of molecular mechanism of binding new inhibitors with the enzyme. At present one of the widely used methods of studying the mechanism of ligand interaction with the enzyme active site is molecular modeling [6].

Molecular modeling is a modern theoretical methods of studying different molecular systems widely applied in search for new biologically active substances. It comprises such research areas as comparative molecular field analysis, molecular descriptors, molecular docking and molecular dynamics.

A comparative molecular field analysis is based on the selection of a ligand that can interact with a biological target, by comparing molecular fields being pharmacophoric indicators in space. The main drawback of this methods is that it is only applicable for substances with similar structures [7].

The use of molecular descriptors allows predicting biological activity of substances using their describing properties (descriptors). The advantages of this method could include the possibility of rapid selection of a large number of substances with suspected activity. However, this method does not allow achieving a high reliability [8].

A molecular docking method is designed to determine the energetically favorable orientations of the explored molecules in the binding site of the macromolecule-target. However, this method is significantly simplified in the calculation of intermolecular and intramolecular interactions that imposes restrictions on the conformational mobility of the ligand-target system elements [9]. Molecular dynamics is a more correct approach that allows taking into account a far greater degree of the conformational mobility, but the use of this method requires more computational resources compared to the method of molecular docking. The method of molecular dynamics is based on modeling of atoms movement in the system, hereby atoms move according to the basic laws of mechanics and electrostatics [10].

Nowadays a molecular dynamics simulation methods could be available for the systems of the size up to millions of atoms making this method applicable for

predicting biological activity at the level of ligand-target interaction.

The aim of the work is a selection of methods of lisinopril interaction modeling with the active center of angiotensin-converting enzyme by molecular dynamics methods.

Materials and methods. An angiotensin-converting enzyme is a Zn^{2+} -dependent peptidase. The enzyme contains two domains (N- and C-domains) consisting of one polypeptide chain. Each domain has a catalytically active center. The C- and N-domains are homologous (the homology is about 60%), they are separated by a bridging sequence [11].

There are two forms of ACE: somatic and testicular. The somatic form is found in many human organs. The testicular form is expressed in testes. These two types of ACE differ in their shape of structure: the testicular has a spherical form, the somatic has an aspherical form. There are also isoforms of the enzyme, which are single-domain forms: free C- and N-domains are formed after the destruction of links between them.

The structure of the N-domain is made up by 621 amino acids that form the ellipsoidal shape of the domain. In the middle of the globule a tunnel is located

that divides the protein into two subdomains. Inside this cavity the active site of the N-domain is situated. In the channel narrowing of the active site a zinc ion is situated. Hereby the separation of the channel into two parts having lengths of 17 Å and 8 Å takes place. It is assumed that the channel length is the limiting factor in binding and hydrolysis of long peptides [12].

The S-domain has the same ellipsoidal shape as the N-domain. The sizes of the S-domain are 72x57x48 Å. In the center of the protein there is a narrow channel having the length of about 30 Å, it divides the enzyme into 2 subdomains. The active site of the enzyme is located in this tunnel; the active site includes a zinc ion, essential for catalysis of ACE [13].

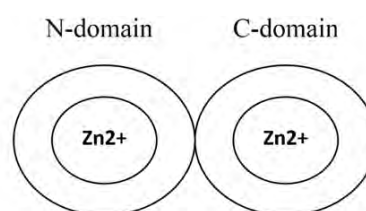


Figure 1 – Schematic structure of ACE

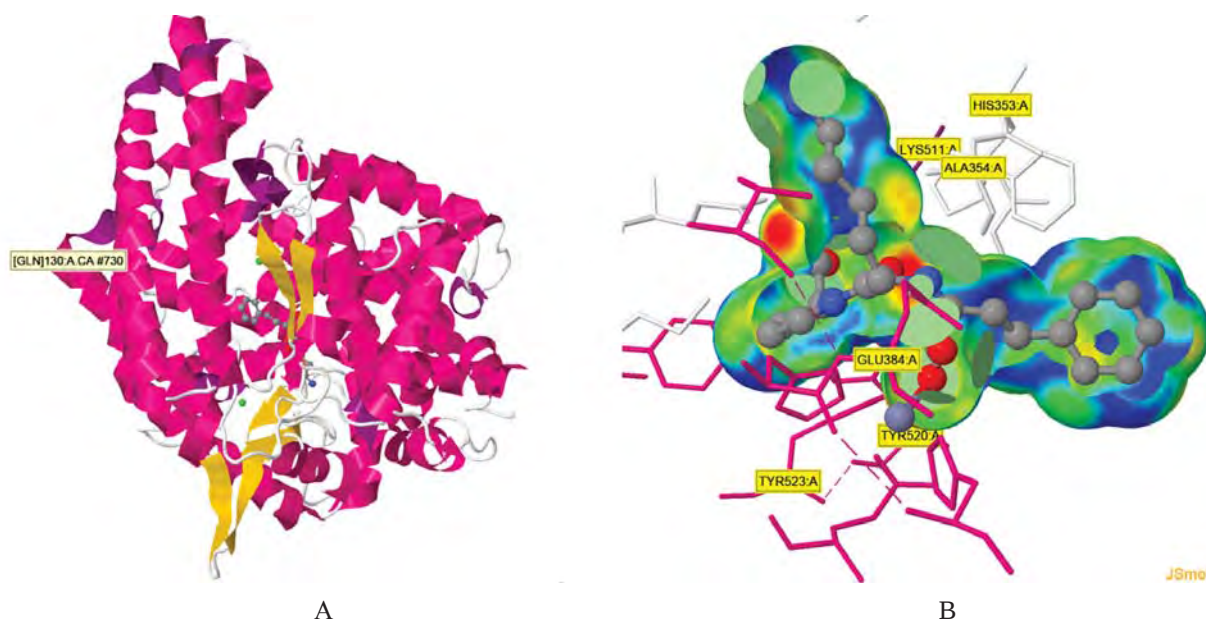


Figure 2 – Location of lisinopril in the molecule of the enzyme in the active site of the N-terminal domain according to the x-ray results (PDB: 1O86) (A – general view of the N-domain, B is the location of the lisinopril molecule in the active site)

For studying low molecular substances (ligands) with the active site of the angiotensin-converting enzyme (ACE) we used a three-dimension structure of the protein-ligand complex, represented in the rcsb.org database (PDB ID is 2x91) [14]. In this model a molecule of lisinopril is represented as a ligand in the active center of ACE.

A spatial model of lisinopril was built in the HyperChem 6.09 program. With this program the geometry optimization with use of the molecular mechanics force field MM+ was also carried out [15]. Further the geometry optimization using the unrestricted Hartree-Fock's

method (UHF) in 3-21G* basis set was carried out. To take into account the electrostatic interaction of the ligand with the enzyme, the atomic charges of the ligand were calculated on the basis of the density functional theory (DFT) method UB3LYP [16]. Hereby-basis sets 6-31G* and 6-311G** [17] were used.

Using the Bioeureka program [18, 19] the interaction of the ligand with the active center of the enzyme was simulated by the molecular dynamics method with the use of Amber94 force field [20]. The calculation of the potential energy for this force field is produced in accordance with the following equation:

$$E_{pot} = \sum_i^{bonds} K_i (r_i - r_{0,i})^2 + \sum_i^{angles} K'_i (\theta_i - \theta_{0,i})^2 + \sum_i^{dihedral\ angles} \frac{V_i}{2} (1 + \cos(n_i \varphi_i - \varphi_{0,i})) + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i,j}^{nonvalent} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \sum_{i,j}^{nonvalent} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

where K_i is an elasticity constant of bond, $\frac{kJ}{mole \cdot (nm)^2}$; r_i is a bond i length, nm; $r_{0,i}$ is an equilibrium bond length, nm; K'_i is a valence angle elasticity constant, $\frac{kJ}{mole \cdot (rad)^2}$; θ_i is a valence angle, radian; $\theta_{0,i}$ is an equilibrium angle, radian; V_i is a dihedral angle constant, $\frac{kJ}{mole}$; φ_i is a dihedral angle, radian; $\varphi_{0,i}$ is an equilibrium dihedral angle, radian; n_i is a multiplier 1, 2, 3, ... i ; r_{ij} is an interatomic distance, nm; ϵ_0 is a dielectric constant, $\frac{F}{m}$; q_i and q_j is an atom charges, C; σ_{ij} and σ_{ij} are Lennard-Jones' potential constants.

This mathematical model takes into account the empirical valence, Van der Waals' and electrostatic interactions in the researched system, hereby having low computational complexity.

The structure of protein was subsequently produced by adding hydrogen atoms in accordance with valences. Further on the protein was embedded into the aqueous environment on the basis of Gromacs program. To take into account the solvent effects the TIP3P water model (three point transferable intermolecular potentials) was used [21]. This model has a rigid geometry of 3 atoms, which are placed at an angle. Each atom of this model has a certain charge but the total charge of the water molecule is equal to zero.

The interaction between nonpolar molecules is described according to the pair Lennard-Jones' potential. The parameters for this interaction were obtained by reproducing the enthalpy of vaporization and density of liquid water at the standard temperature [22]. The TIP3P water model is widespread in molecular modeling, be-

cause it allows to obtain sufficiently accurate results in the simulation of the hydrated protein structures.

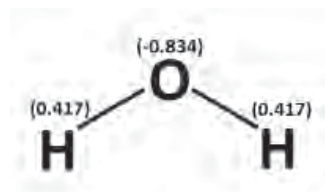


Figure 3 – Atomic charges of TIP3P water model

As the initial condition, the ligand was located in the cavity of the active center of the enzyme.

The gradient descent methods was used for the geometry optimization of the structure. The gradient describes the direction of the maximum increase of the function with variables (in this case, the coordinates of the atoms in space play the role of variables). Thus, taking antigradient, it is possible to find the direction of the greatest decrease. In case of geometry optimization the minimum of the potential energy of the molecular system is searched for, which corresponds to the energetically most favorable arrangement of atoms in space.

In the next stage the molecular dynamics simulation of the researched system was performed. The duration of molecular dynamics simulation was 75 ns and the integration step was 1 fs. The temperature control was carried out using Berendsen's algorithm [23] with the temperature up to 310 K (Table 1).

Table 1 – Simulation temperature

Time (fs)	Temperature (K)
1	0
300000	10
500000	310

As a result of a molecular dynamics, a trajectory of the system of «lisinopril-ACE» was obtained. After that a comparison of the ligand conformations at different points in simulation time with the experimental conformation was made. For this purpose the AutoDockTools program [24] was used. It simultaneously displayed two locations of lisinopril in the active center of ACE – theoretical and experimental (Table 3).

For quantifying the differences of the lisinopril molecule location in the active center of ACE according to the results of simulation from the location known from the x-ray analysis results the calculation of the root mean square deviation [25] of the ligand relative to the exper-

imental conformation was carried out. Calculating the root mean square deviation (RMSD) was made according to the equation:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N r_i^2}$$

where RMSD is a root mean square deviation, nm; N is a number of atoms; r_i is a distance between the corresponding atoms i , nm.

Results and discussion. The atomic charges of the ligand, calculated on the basis of the density functional theory (DFT) method ub3lyp using the basis sets 6-31G* and 6-311G**, are presented in Table 2.

Table 2 – The atomic charges of the lisinopril molecule calculated by the density functional theory method *ub3lyp* using basis sets 6-31G* and 6-311G**

№	Atom	Charges 6-31G*	Charges 6-311G**	№	Atom	Charges 6-31G*	Charges 6-311G**
1	O	-0.534	-0.412	30	H	0.427	0.303
2	O	-0.589	-0.472	31	H	0.436	0.311
3	O	-0.601	-0.488	32	H	0.225	0.187
4	O	-0.586	-0.470	33	H	0.172	0.152
5	N	-0.624	-0.328	34	H	0.156	0.141
6	N	-0.434	-0.421	35	H	0.166	0.134
7	N	-0.718	-0.320	36	H	0.130	0.100
8	C	0.635	0.467	37	H	0.160	0.130
9	C	-0.122	-0.121	38	H	0.133	0.108
10	C	0.509	0.325	39	H	0.123	0.094
11	C	-0.016	-0.082	40	H	0.168	0.134
12	C	-0.007	-0.014	41	H	0.151	0.112
13	C	-0.294	-0.218	42	H	0.250	0.183
14	C	-0.304	-0.269	43	H	0.168	0.132
15	C	-0.130	-0.012	44	H	0.172	0.139
16	C	0.573	0.361	45	H	0.281	0.222
17	C	-0.166	-0.152	46	H	0.227	0.185
18	C	-0.102	-0.075	47	H	0.158	0.115
19	C	-0.351	-0.244	48	H	0.161	0.133
20	C	-0.248	-0.171	49	H	0.147	0.120
21	C	-0.287	-0.187	50	H	0.181	0.144
22	C	-0.359	-0.201	51	H	0.135	0.089
23	C	0.159	-0.114	52	H	0.125	0.082
24	C	-0.180	-0.052	53	H	0.116	0.077
25	C	-0.128	-0.088	54	H	0.120	0.079
26	C	-0.131	-0.085	55	H	0.135	0.085
27	C	-0.128	-0.088	56	H	0.381	0.264
28	C	-0.183	-0.054	57	H	0.427	0.302
29	H	0.385	0.277	58	O	-0.669	-0.549

Using Bioeureka' program, in the process of molecular dynamics simulation, the lisinopril molecule was placed into the active center of the ACE. At the end of the simulations the trajectory was exported and then the comparison between theoretical and experimental conformations in the program AutoDockTools was made. The conformations of lisinopril in the active center for charges of atoms, calculated using the basis sets 6-31G* and 6-311G**, are shown in Table 3.

According to the results of molecular dynamics simulation with the charges corresponding to basis set 6-31G*, lisinopril does not lose its conformational stability in the active center of the enzyme. At 70.0 ns lisinopril is losing its stable bond with the amino group of lysine Lys-495 located in the active center of the ACE. In this case two

carboxyl groups are attracted to the zinc ion which does not correspond to the results of the x-ray analysis.

When using 6-311G** basis set for the lisinopril atomic charges calculation, the carboxyl group located near the peptide group of lisinopril binds with the zinc ion and the other carboxyl group of lisinopril, which is in the ortho-position relatively to the nitrogen atom of the heterocycle pyrrolidinone, is connected with the amino-group of lysine Lys-495. This location of the lisinopril molecule in the active site of the ACE corresponds to the results of x-ray analysis and the location is retained after 70.0 ns of molecular dynamics of ACE.

For the obtained results of molecular dynamics simulation, the root mean square deviation of simulation lisinopril conformation, regarding to the experimental conformation, was calculated (Table 4).

Table 3 – Location of the lisinopril molecule in the active center of ACE according to the results of molecular dynamics simulation (basis set 6-31G* and basis set 6-311G) in comparison with the experimental results (molecular dynamics► , x-ray analysis —►)**

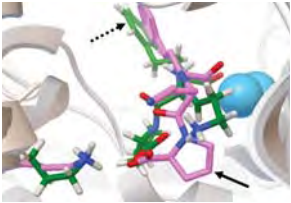
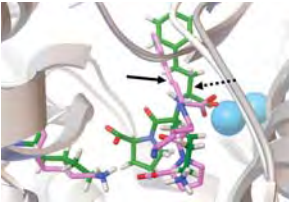
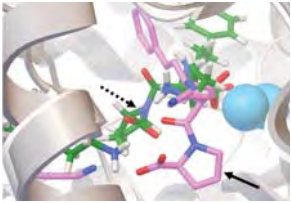
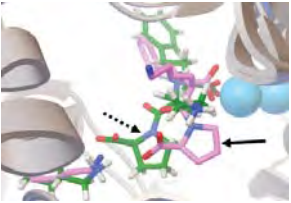
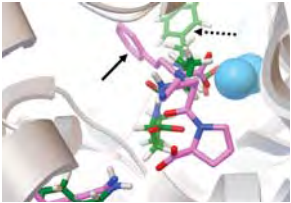
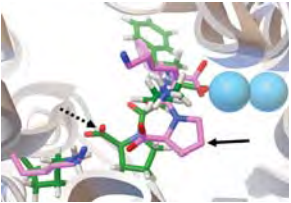
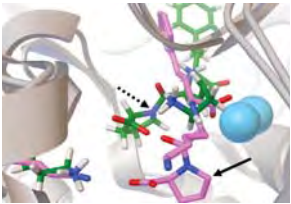
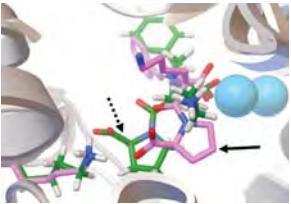
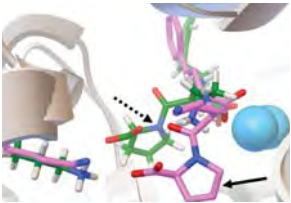
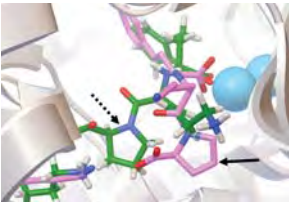
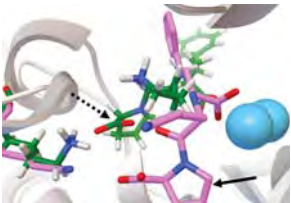
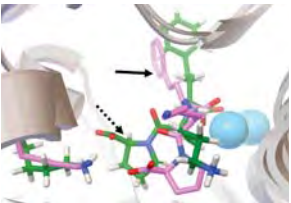
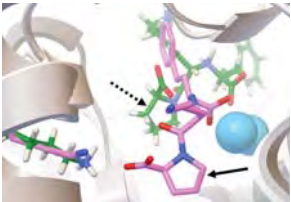
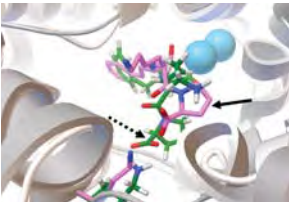
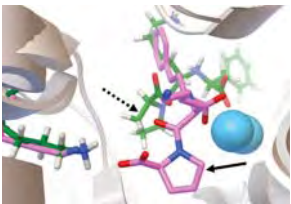
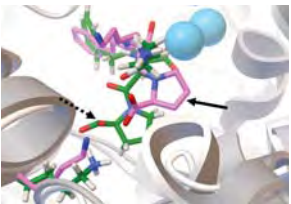
Time (ns)	Basis set 6-31G*	Basis set 6-311G**
10.5		
20.4		
30.3		
40.1		
50.0		
60.5		
70.0		
70.5		

Table 4 – Root mean square deviation of lisinopril conformation according to the results of molecular dynamics simulation regarding to the experimental conformation

Time (ns)	Root mean square deviation (basis set 6-31G*), nm	Root mean square deviation (basis set 6-311G**), nm
10.5	4.584	5.110
20.4	6.625	3.302
30.3	5.779	3.352
40.1	5.651	3.122
50.0	6.047	3.780
60.5	6.284	3.322
70.0	9.893	3.480
70.5	9.703	3.190

Figure 4 (Table 4) shows that the root mean square deviation for the basis set 6-31G* beginning with 70.0 ns of molecular dynamic simulation makes a sharp increase,

while the root mean square deviation corresponding to the basis set 6-311G** stays is in the range of the tenths parts during all time of the simulation.

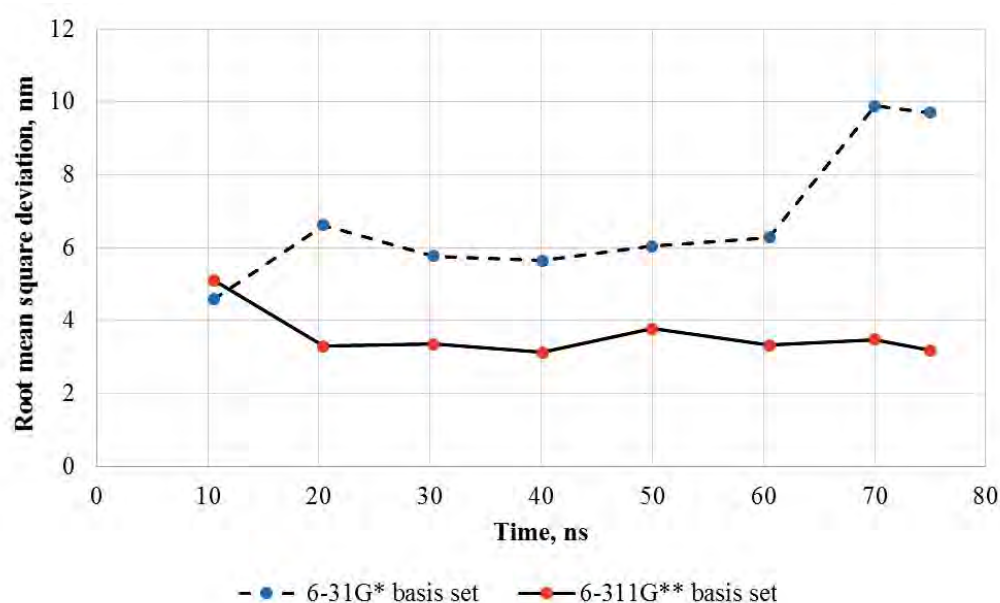


Figure 4 – Changes of root mean square deviation of lisinopril conformation according to the results of molecular dynamics simulation regarding to the experimental conformation

The results of the simulation of lisinopril interaction with the active center of the ACE with the usage of atomic charges calculated in different basis sets (basis set 6-31G* and basis set 6-311G**) were different. Basis set 6-311G** is more suitable for the calculation of atomic charges of the ligand in of molecular dynamics of the ACE. In this case, the correct location of lisinopril in the active center of ACE retained stable and corresponded to the results of the x-ray analysis.

Conclusion. Based on the results of molecular dynamics simulation of lisinopril interaction with the enzyme active center it can be concluded that the method of calculation of atomic charges is an important parameter,

which should be considered in the studying of substances interaction with the active center of the enzyme. Presumably, 6-311G** basis set can be used in this method to calculate atomic charges of the molecules, which are similar in the chemical structure with lisinopril and the ones having a zero charge.

According to the results of the study, a quantum chemical method suitable for the calculation of atomic charges of the ligand has been selected, and also the methods and parameters of molecular dynamics simulation allowing to achieve the theoretical playback of ligand binding with the active center according to the x-ray analysis results.

Библиографический список

1. Hilal-Dandan R. Renin and Angiotensin. Chapter 26 in the book "Goodman & Gilman's". The pharmacological basis of therapeutics (12th ed.) / edited by Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker. New York: McGraw-Hill, 2006. P. 721–744.
2. Bangalore S., Fakheri R., Wandel S., Toklu B., Wandel J., Messerli F.H. Renin angiotensin system inhibitors for patients with stable coronary artery disease without heart failure: systematic review and meta-analysis of randomized trials // *BMJ (Clinical research ed.)*. 2017. N. 356. URL: <http://www.bmj.com/content/356/bmj.j4> (дата обращения: 03.10.2017). DOI:10.1136/bmj.j4
3. Shafi S. Role of ace inhibitors in atherosclerosis. *International journal of biomedical and advance research*. 2013. N. 12. P. 849–854.
4. Jandeleit-Dahm K., Cooper M.E. Hypertension and diabetes: role of the renin-angiotensin system // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2006. N. 35 (3). P. 469–490. DOI:10.1016/j.ecl.2006.06.007
5. Преображенский Д.В., Некрасова Н.И., Талызина И.В., Патарая С.А., Бугримова М.А. Лизиноприл – гидрофильный ингибитор ангиотензинпревращающего фермента длительного действия: особенности клинической фармакологии и диапазон клинического применения // *PMЖ*. 2010. №10. С. 684.
6. Mollica L., Theret I., Antoine M., Perron-Sierra F., Charton Y., Fourquez J.-M., Wierzbicki M., Boutin J.A., Ferry G., Decherchi S., Bottegoni G., Ducrot P., Cavalli A. Molecular dynamics simulations and kinetic measurements to estimate and predict protein–ligand residence times // *J. Med. Chem.* 2016. N. 59 (15). P. 7167–7176. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00632
7. Sharma R., Dhingra N., Patil S. CoMFA, CoMSIA, HQSAR and molecular docking analysis of ionone-based chalcone derivatives as antiprostata cancer activity // *Indian J. Pharm. Sci.* 2016. N. 78(1). P. 54–64.
8. Гарсиа-Джакас С.Р., Авдеенко Т.В. Мультисерверный подход к высокопроизводительному вычислению молекулярных дескрипторов // *Научный вестник НГТУ*. 2015. № 1. С. 148–160. DOI: 10.17212/1814-1196-2015-1-148-160
9. Глушко А.А., Воронков А.В., Кодониди И.П., Бичеров А.В., Черников М.В. Молекулярный докинг N-замещенного производного изохинолона с каталитическим доменом С // *Фармация и фармакология*. 2014. №1 (2). С. 3–7. DOI: 10.19163/2307-9266-2014-2-1(2)-3-7
10. Норман Г.Э., Стегайлов В.В. Стохастическая теория метода классической молекулярной динамики // *Матем. Моделирование*. 2012. № 6. С. 3–44.
11. Soubrier F., Alhenc-Gelas F., Hubert C., Allegrini J., John M., Tregear G., Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988. N. 85. P. 9386–9390.
12. Corradi H.R., Schwager S.L.U., Nchinda A.T., Sturrock E.D., Acharya K.R. Crystal structure of the N domain of human somatic angiotensin I-converting enzyme provides a structural basis for domain-specific inhibitor design // *J. Mol. Biol.* 2006. N. 357. P. 964–974. DOI: <http://10.1016/j.jmb.2006.01.048>
13. Natesh R., Schwager S. L. U., Sturrock E. D., Acharya K. R. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex // *Nature*. 2003. N. 421. P. 551–554. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nature01370>
14. Akif M., Georgiadis D., Mahajan A., Dive V., Sturrock E.D., Isaac R.E., Acharya K.R. High resolution crystal structures of drosophila melanogaster angiotensin converting enzyme in complex with novel inhibitors and anti-hypertensive drugs // *J. Mol. Biol.* 2010. N 400. P. 502–517. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.05.024
15. Teppen B.J. HyperChem, release 2: molecular modeling for the personal computer // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1992. V. 32. P. 757–759.
16. Stephens P.J., Devlin F.J., Chabalowski C.F., Frisch M.J. Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields // *J. Phys.* 1994. N. 98 (45). P. 11623–11627. DOI: 10.1021/j100096a001
17. Минкин В.И., Симкин Б.Я., Миняев Р.М. Строение молекул. Ростов-на-Дону: Феникс, 1997. 560 с.
18. Гендугов Т.А., Щербакова Л.И., Глушко А.А., Кодониди И.П., Сочнев В.С. Изучение взаимодействия производных 4-оксопиримидина с активным центром циклооксигеназы-2 методом молекулярной динамики // *Современные проблемы науки и образования*. 2015. №2. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=22796> (дата обращения: 10.06.2017).
19. Халилова С.В. Моделирование процесса жидкостной экстракции биологически активных веществ методом молекулярной динамики в программе Биоэврика // *Сборник материалов VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего»*. Санкт-Петербург, 25–26 апреля 2016 г. СПб.: Изд-во СПбХФА. 2016. С. 118–120.
20. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. N. 117 (19). P. 5179–5197. DOI: 10.1021/ja00124a002
21. Leontyev I.V., Stuchebrukhov A.A. Polarizable mean-field model of water for biological simulations with AMBER and CHARMM force fields // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. N. 8 (9). P. 3207–3216. DOI: 10.1021/ct300011h
22. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // *J. Chem. Phys.* 1983. V. 79. N. 2. P. 926–935. DOI: 10.1063/1.445869
23. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R.. Molecular dynamics with coupling to an external bath // *J. Chem. Phys.* 1984. N. 81. P. 3684–3690. DOI: <http://10.1063/1.448118>

24. Forli S., Huey R., Pique M.E., Sanner M.F., Goodsell D.S., Olson A.J. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite // *Nature Protocols*. 2016. V. 11. N. 5. P. 905–919. DOI: 10.1038/nprot.2016.051
25. Hildebrandt A.K., Dietzen M., Lengauer T., Lenhof H.P., Althaus E., Hildebrandt A.
26. Efficient computation of root mean square deviations under rigid transformations // *J. Comput. Chem.* 2014. N. 35 (10). P. 765–771. DOI: 10.1002/jcc.23513

References

1. Hilal-Dandan R. Renin and Angiotensin. Chapter 26. In Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker, editors. “Goodman & Gilman’s”. The pharmacological basis of therapeutics (12th ed.). New York: McGraw-Hill; 2006:721–44.
2. Bangalore S, Fakheri R, Wandel S, Toklu B, Wandel J, Messerli FH. Renin angiotensin system inhibitors for patients with stable coronary artery disease without heart failure: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *BMJ (Clinical research ed.)* [Internet]. 2017;356. [cited 2017 Nov 03]. Available from: <http://www.bmj.com/content/356/bmj.j4>. DOI:10.1136/bmj.j4
3. Shafi S. Role of ace inhibitors in atherosclerosis. *International journal of biomedical and advance research*. 2013;12:849–54.
4. Jandeleit-Dahm K, Cooper ME. Hypertension and diabetes: role of the renin-angiotensin system. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2006;35(3):469–90. DOI:10.1016/j.ecl.2006.06.007
5. Preobrazhenskii DV, Nekrasova NI, Talyzina IV, Pataria SA, Bugrimova MA. Lizinopril gidrofilnyy ingibitor angiotenzinprevrashchayushchego fermenta dlitel'nogo dejstviya osobennosti klinicheskoy farmakologii i diapazon klinicheskogo primeneniya [Lisinopril is hydrophilic angiotensinconverting enzyme inhibitor long-acting: features of clinical pharmacology and the range of clinical applications]. *RMJ*. 2010;10:684. Russian.
6. Mollica L, Theret I, Antoine M, Perron-Sierra F, Charton Y, Fourquez J-M, Wierzbicki M, Boutin JA, Ferry G, Decherchi S, Bottegoni G, Ducrot P, Cavalli A. Molecular dynamics simulations and kinetic measurements to estimate and predict protein–ligand residence times. *J. Med. Chem.* 2016;59(15):7167–76. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00632
7. Sharma R, Dhingra N, Patil S. CoMFA, CoMSIA, HQSAR and molecular docking analysis of ionone-based chalcone derivatives as antiprostata cancer activity. *Indian J Pharm Sci.* 2016 Jan-Feb;78(1):54–64.
8. Garsia-Dzhakas SR, Avdeenko TV. Multiservernyy podhod k vysokoproizvoditel'nomu vychisleniyu molekulyarnykh deskriptorov [Multi-server approach to high-performance calculating of the molecular descriptors]. *Science bulletin NSTU*. 2015;58:148–60. DOI: 10.17212/1814-1196-2015-1-148-160. Russian.
9. Gloushko AA., Voronkov AV., Kodonidi IP., Bicherov AB., Chernikov MB. Molekulyarnyy doking N-zameshchennogo proizvodnogo izohinolonas kataliticheskim domenom C [Molecular docking of N-substituted derivative of isoquinolone with catalytic domain of protein kinase C]. *Pharmacy & Pharmacology*. 2014;1(2):3–7. DOI: 10.19163/2307-9266-2014-2-1(2)-3-7. Russian.
10. Norman GJe., Stegailov VV. Stokhasticheskaya teoriya metoda klassicheskoy molekulyarnoy dinamiki [Stochastic theory of the classical molecular dynamics]. *Matematischeskie modeli i komp'yuternoye modelirovaniye*. 2012;6(24):3–44. Russian.
11. Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988;85:9386–90.
12. Corradi HR, Schwager SLU, Nchinda AT, Sturrock ED, Acharya KR. Crystal structure of the N domain of human somatic angiotensin I-converting enzyme provides a structural basis for domain-specific inhibitor design. *J. Mol. Biol.* 2006;357:964–74. DOI: <http://10.1016/j.jmb.2006.01.048>
13. Natesh R, Schwager SLU, Sturrock ED, Acharya KR. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature*. 2003;421:551–4. DOI: 10.1038/nature01370
14. Akif M, Georgiadis D, Mahajan A, Dive V, Sturrock ED, Isaac RE, Acharya KR. High resolution crystal structures of drosophila melanogaster angiotensin converting enzyme in complex with novel inhibitors and anti-hypertensive drugs. *J. Mol. Biol.* 2010;400:502–17. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.05.024
15. Teppen BJ. HyperChem, release 2: molecular modeling for the personal computer. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1992;6(32):757–9.
16. Stephens PJ, Devlin FJ, Chabalowski CF, Frisch MJ. Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *J. Phys.* 1994;98(45):11623–7. DOI: 10.1021/j100096a001
17. Minkin VI, Simkin BI, Miniaev RM. Stroenie molekul [The structure of the molecules]. Rostov-on-don: Phoenix; 1997. 560 p. Russian.
18. Gendugov TA, Shcherbakova LI, Glushko AA, Kodonidi IP, Sochnev VS. Izuchenie vzaimodeystviya proizvodnykh 4-okso-pirimidina s aktivnym centrom ciklooksigenazy-2 metodom molekulyarnoy dinamiki [Study of 4-oxo-pyrimidine derivatives interaction with the active site of cyclooxygenase-2 using molecular dynamics]. *Modern problems of science and education*. [Internet] 2015;2. [cited 2017 Jun 10]. Available from: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=22796>. Russian.
19. Khalilova SV. Modelirovaniye processa zhidkostnoy ekstrakcii biologicheskii aktivnykh veshchestv metodom

- молекулярной динамики в программе Bioevrika [Modeling of solvent extraction process of biologically active substances by the method of molecular dynamics in the program of Bioafrica]. The collection of materials of VI all-Russian scientific conference of students and postgraduates with international participation "Young pharmacy is a potential future"; 2016 April 25–26; St. Petersburg: Publishing house of SPCPA; 2016:118–20. Russian.
20. Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KM, Ferguson DM, Spellmeyer DC, Fox T, Caldwell JW, Kollman PA. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1995;117(19):5179–97. DOI: 10.1021/ja00124a002
 21. Leontyev IV, Stuchebrukhov AA. Polarizable mean-field model of water for biological simulations with amber and charmm force fields. *J. Chem. Theory Comput.* 2012;8(9):3207–16. DOI: 10.1021/ct300011h
 22. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 1983;79(9):926–35. DOI: 10.1063/1.445869
 23. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 1984;81:3684–90. DOI: 10.1063/1.448118
 24. Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols.* 2016;5(11):905–19. DOI: 10.1038/nprot.2016.051
 25. Hildebrandt AK, Diezen M, Lengauer T, Lenhof HP, Althaus E, Hildebrandt A. Efficient computation of root mean square deviations under rigid transformations. *J Comput Chem.* 2014. Apr 15;35(10):765–71. DOI: 10.1002/jcc.23513

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы:

Глушко Александр Алексеевич – кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры неорганической, физической и коллоидной химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: компьютерная химия, разработка программного обеспечения для молекулярного моделирования, молекулярный докинг, молекулярная динамика, QSAR. E-mail: alexander.glushko@lcmmp.ru

Чиряпкин Алексей Сергеевич – студент Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: молекулярное моделирование, молекулярный докинг, молекулярная динамика. E-mail: alexxx704@yandex.ru

Чиряпкин Виталий Сергеевич – студент Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: молекулярное моделирование, молекулярный докинг, молекулярная динамика. E-mail: chiryapkin.v@yandex.ru

Муртузалиева Асият Мурадовна – студентка Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: молекулярное моделирование, молекулярный докинг, молекулярная динамика. E-mail: a.murtuzaliev98@mail.ru

Полковникова Юлия Александровна – кандидат фармацевтических наук, доцент Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет». Область научных интересов: молекулярное моделирование, молекулярная динамика, технология лекарств. E-mail: juli-polk@mail.ru

Autors:

Glushko Alexander Alekseevich – Candidate of Sciences (Pharmacy), Lecturer of the Department of Inorganic, Physical and Colloid Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: computational chemistry, development of software for molecular modeling, molecular docking, molecular dynamics, QSAR. E-mail: alexander.glushko@lcmmp.ru

Chiriapkin Alexey Sergeevich – student of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: molecular modeling, molecular docking, molecular dynamics. E-mail: alexxx704@yandex.ru

Chiriapkin Vitaly Sergeevich – student of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: molecular modeling, molecular docking, molecular dynamics. E-mail: chiryapkin.v@yandex.ru

Murtuzaliev Asyat Muradovna – student of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: molecular modeling, molecular docking, molecular dynamics. E-mail: a.murtuzaliev98@mail.ru

Polkovnikova Yulia Alexandrovna – Candidate of Sciences (Pharmacy), docent of Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Voronezh State University". Research interests: molecular modeling, molecular dynamics, drug technology. E-mail: juli-polk@mail.ru

Поступила в редакцию: 23.08.2017
Отправлена на доработку: 20.09.2017
Принята к печати: 09.10.2017

Received: 23.08.2017
Sent back for revision: 20.09.2017
Accepted for publication: 09.10.2017

УДК 614.27.45:615.12:616.98(470.620)

ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ В УЧРЕЖДЕНИЯХ УГОЛОВНО- ИСПОЛНИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ

И.В. Калинин¹, Т.И. Кабакова²

¹ Федеральное казенное учреждение здравоохранения

«Медико-санитарная часть № 23 Федеральной службы исполнения наказаний»,
350018, Россия, г. Краснодар, ул. Камвольная, д. 10

E-mail: kalinin-i-v@mail.ru

² Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал ФГБОУ ВО

«Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России,
357532, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, д. 11

E-mail: kabtais@mail.ru

Стремительное распространение вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекции) ведет не только к потере здоровья лицами, содержащимися в пенитенциарных организациях, но и к увеличению материальных затрат на лекарственное обеспечение инфицированных в условиях дефицита бюджета Российской Федерации. **Целью исследования** явилось исследование проблем лекарственного обеспечения ВИЧ-инфицированных и поиск их решения. **Материалы и методы.** Исследование проведено на основе статистических данных, медицинской отчетности и бухгалтерских отчетов пенитенциарной медицинской организации с использованием методов контент-анализа, документального наблюдения, группировки и сравнения показателей. **Результаты и обсуждение.** Установлено, в учреждениях уголовно-исполнительной системы стремительно продолжает расти число ВИЧ-инфицированных. Определено, что в настоящее время в уголовно-исполнительной системе (УИС) Кубани используется только 5 классов антиретровирусных лекарственных препаратов из 10 классов, представленных на Российском фармацевтическом рынке. При этом наибольшее количество лекарственных препаратов, используемых в пенитенциарной медицинской организации для проведения антиретровирусной терапии (АРВТ), относится к классам «Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы» и «Ингибиторы протеазы», а остальные классы АРВТ лекарственных препаратов представлены только 1 международным непатентованным наименованием (ралтегравир, энфувиртид, этравирин). Лекарственные препараты для лечения социально значимых инфекционных заболеваний поставляются в рамках централизованных поставок и полностью обеспечивают региональную потребность. Выявлена и определена структура поставщиков. Основными поставщиками в 2016 г. явились АО «Национальная иммунобиологическая компания» и АО «Р-ФАРМ». Установлен острый недостаток лекарственных препаратов для лечения оппортунистических инфекций, ввиду недостаточного финансирования. Определена необходимость в срочной замене материально-технической базы пенитенциарных аптек для соблюдения правил хранения лекарственных средств и обеспечения их сохранности. Выявлены несовершенство учета медикаментов и острая необходимость централизации систем персонифицированного учета. Определена реальная потребность в увеличении финансирования и создания центральной аптечной организации. **Заключение.** Выявленные недостатки свидетельствуют об острой потребности в открытии центральной аптечной организации в территориальных органах уголовно-исполнительной системы и создания централизованной системы персонифицированного учета медицинского имущества, а также в совершенствовании процесса ведения медицинской документации и увеличении объемов финансирования.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, антиретровирусная терапия, уголовно-исполнительная система

Для цитирования:

Калинин И.В., Кабакова Т.И.
ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ
ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ В УЧРЕЖДЕНИЯХ
УГОЛОВНО-ИСПОЛНИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ.
Фармация и фармакология. 2017;5(5):504-515.
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-504-515
© Калинин И.В., Кабакова Т.И., 2017

For citation:

Kalinin I.V., Kabakova T.I.
DRUG PROVISION OF HIV-INFECTED CRIMINALS IN
INSTITUTIONS OF CRIMINAL-EXECUTIVE SYSTEM
OF KRASNODAR REGION.
Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(5):504-515. (In Russ.)
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-504-515

DRUG PROVISION OF HIV INFECTED CRIMINALS IN INSTITUTIONS OF CRIMINAL-EXECUTIVE SYSTEM OF KRASNODAR REGION

I.V. Kalinin¹, T.I. Kabakova²

¹Federal state healthcare institution "Medical and sanitary unit No. 23 of the Federal criminal-executive system",
10, Kamvolnaya Str., Krasnodar, Russia, 350018

E-mail: kalinin-i-v@mail.ru

²Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University,
11, Kalinina Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

E-mail: kabtais@mail.ru

The rapid spread of human immunodeficiency virus (HIV) leads not only to loss of health in persons held in penitentiary institutions, but also to an increase in material costs for drug coverage of the infected, causing the deficit in the budget of the Russian Federation. **The aim** of the study is the investigation of the problems in drug supply of HIV-infected people and to search for their solutions. **Materials and methods.** The investigation was conducted on the basis of statistic data, medical statements and accounting to reports of the penitentiary medical organization using methods of analysis, documentary observation, grouping and comparison of data. **Results and discussion.** It has been established that in institutions of the penal system the number of HIV-infected criminals continues to grow rapidly. It has been determined that currently in the criminal-executive system (CES) of Kuban' only 5 classes of antiretroviral drugs out of the 10 classes represented on the Russian pharmacy market are used. Hereby the greatest number of drugs used in prison medical organization for conducting antiretroviral therapy (ARVT), are classified as "Nucleoside reverse transcriptase inhibitors" and "Protease Inhibitors", and other classes of art drugs are represented by only one international nonproprietary name (raltegravir, enfuvirtide, etravirine). Drug treatment of socially significant infectious diseases is supplied centrally and completely satisfies regional needs. The structure of suppliers has been identified and determined. In 2016 the main suppliers were Joint-stock companies (JSC) "National Immunobiological Company" and "R-PHARM". An acute shortage of drugs for opportunistic infections due to insufficient funding has also been determined. The necessity for urgent replacement of material-technical base in prison pharmacies for compliance with the rules of storage of medicines which can ensure their safety was identified. The imperfection of accounting medicines and urgent necessity of the centralization system of personified registration were revealed. Real needs in funding increasing and the establishment of Central pharmacy were identified. **Conclusion.** The revealed deficiencies indicate a critical need for opening Central pharmacy in the territorial bodies of the criminal-executive system and establishing a centralized system of personified registration of medical property, as well as improving the process of medical record keeping and the increase in funding.

Keywords: HIV infection, antiretroviral therapy, criminal-executive system

Введение. В настоящее время активизация распространения вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекции) в Восточной Европе и Центральной Азии требует усилий по противодействию заболеванию и преодолению его последствий [1–4]. Особенностью заболевания является развитие у ВИЧ-инфицированных сопутствующих заболеваний [5–8]. Борьба с оппортунистическими инфекциями является одной из основных задач при лечении ВИЧ в условиях пенитенциарного здравоохранения [9–12]. Случаи ВИЧ-инфекции, ассоциированной с туберкулезом или вирусными гепатитами в учреждениях уголовно-исполнительной системы (УИС), составляют более половины от общего числа заболеваний [13]. При этом ВИЧ-инфекция уменьшает эффективность лечения туберкулеза и влияет на его прогрессирование [14–17]. В 1991 году на юге России регистрируются вспышки внутрибольничной заболеваемости ВИЧ-инфекции [18]. Большинство ВИЧ-позитивных в Российской Федерации составляют мужчины [19, 20], основная часть которых была заражена при употреблении инъекционных наркотиков [19, 21].

Целью настоящего исследования явилось изу-

чение особенностей обеспечения лекарственными препаратами (ЛП) в пенитенциарных учреждениях Краснодарского края для последующего анализа проблем и поиска их решений.

Материалы и методы. Для проведения исследования были использованы методы статистического и системного анализа, сравнения и группировки показателей. Материалами исследования служили отчеты о деятельности федерального казенного учреждения здравоохранения «Медико-санитарная часть № 23 Федеральной службы исполнения наказаний» (ФКУЗ МСЧ-23 ФСИН России) России за 2015–2016 гг; данные бухгалтерской отчетности; отчеты о заболеваемости и смертности спецконтингента в региональной пенитенциарной медицинской организации за 2015–2016 гг; данные выездных проверок территориальных органов Росздравнадзора по Краснодарскому краю и Республике Адыгея.

Результаты и обсуждение. В ходе проведенных нами исследований установлено, что медицинское обеспечение подозреваемых, обвиняемых, осужденных, содержащихся в учреждениях УИС Краснодарского края, и сотрудников Управления федеральной

службы исполнения наказаний (УФСИН) России по Краснодарскому краю (КК) и УФСИН России по Республике Адыгея (РА) осуществляют 25 филиалов ФКУЗ МСЧ-23 ФСИН России на основании лицензий, выданных Территориальными органами Росздравнадзора на право осуществления медицинской и фармацевтической деятельности, а также лицензий на деятельность по обороту наркотических средств, психотропных веществ, их прекурсоров, культивированию наркосодержащих растений.

Выявлено, что деятельность филиалов осуществляется в соответствии с Уставом, законодательными и иными правовыми актами, приказами Минюста России и ФСИН России, а также нормативными актами и приказами Минздрава России, МВД России и других федеральных органов исполнительной власти, положениями о филиалах. Для недопущения невыполнения поставленных перед пенитенциарной медицинской организацией (МО) задач, по всем направлениям деятельности составляются полугодовые планы, утверждаемые начальником учреждения.

Положительно, что вопросы взаимодействия ФКУЗ МСЧ-23 ФСИН России с УФСИН по Краснодарскому краю и УФСИН по Республике Адыгея регламентированы соглашением о взаимодействии. При этом вопросы организации деятельности филиалов осуществляются на основании ряда утвержденных комиссий, рассматривающих вопросы случаев смерти среди подозреваемых, обвиняемых и осужденных в учреждениях, а также закупок, учетной политики, охраны труда, работы врачебных комиссий, хранения, учета и расходования лекарственных препаратов и медицинских изделий.

Определено, что обязанности сотрудников регламентированы должностными инструкциями, утвержденными начальником ФКУЗ МСЧ-23 ФСИН России и подписанными сотрудниками. Однако должностные инструкции не в полной мере отражают особенности работы в пенитенциарной медицинской организации, что, в свою очередь, приводит к нарушениям трудовой дисциплины. Контроль качества оказания медицинской помощи в филиалах осуществляется в процессе плановых и внеплановых проверок, проводимых руководством ФКУЗ МСЧ-23 ФСИН России в соответствии с квартальными графиками выездов

в учреждения кураторов по направлениям деятельности, утверждаемыми приказом территориального УФСИН.

В ходе изучения установлено, что ввиду недостаточной укомплектованности штатного расписания должностями медицинских работников и отсутствия в МО централизованного программного комплекса для автоматизации деятельности, оказывающих медицинскую помощь, как в амбулаторно-поликлинических, так и в стационарных условиях, медицинские работники из-за высокой нагрузки не всегда указывают жалобы, подробные анамнестические данные о перенесенных заболеваниях, травмах, операциях, не описывают объективный статус, и код диагноза согласно МКБ-10. Следует подчеркнуть, что не указывается дозировка и кратность приема лекарственных препаратов, записываются только диагноз и схема лечения больного, а также данные лабораторных и инструментальных исследований. Необходимо отметить, что установленный в филиалах программный комплекс учета ЛП и медицинских изделий не объединён в единую систему, что значительно ухудшает работу по учету материальных запасов в МО и не дает возможности их оперативного перераспределения по филиалам.

Установлено, что по состоянию на 16.01.2017 г. в ФКУЗ МСЧ-23 ФСИН России укомплектовано только 89,6% должностей медицинских работников, ввиду острого дефицита кадров на региональном рынке и низкой заработной платы, по сравнению со средними по региону для данных категорий работников.

Согласно Постановлению Правительства Российской Федерации от 06.02.2004 г. № 54 «О медицинском освидетельствовании осужденных, представляемых к освобождению от отбывания наказания в связи с болезнью», в 2016 г. было освобождено на 95% лиц больше, чем в 2014 г. Основными причинами по освобождению подозреваемых и подсудимых явились ВИЧ-инфекция, сахарный диабет, патология органов кровообращения, последствия перенесенной спинномозговой травмы и острого нарушения мозгового кровообращения.

Проанализированы отчеты (форма ВИЧ-23) для определения числа ВИЧ-инфицированных лиц в УИС Краснодарского края за 2014–2016 гг (табл. 1).

Таблица 1 – Количество лиц, инфицированных ВИЧ в УИС по Краснодарскому краю

Годы	2014		2015		2016	
Показатели	Средне- списочная численность спецконтин- гента, чел.	Кол-во ВИЧ-инфици- рованных, %	Средне- списочная численность спецконтин- гента, чел.	Кол-во ВИЧ-инфици- рованных, %	Средне- списочная численность спецконтин- гента, чел.	Кол-во ВИЧ-инфици- рованных, %
	14980	2,44	14725	2,76	15188	4,09
Выявлено новых случа- ев, %	44,53		50,61		36,55	

Как следует из данных таблицы 1, количество ВИЧ-инфицированных в пенитенциарных учреждениях Краснодарского края увеличилось с 2014 г. на 80,6%, что свидетельствует о быстром распространении инфекции в преступной среде. Необходимо подчеркнуть, что ВИЧ-инфекция в стадии СПИДа явилась основной причиной смерти 17,39% умерших в УИС Краснодарского края. Таким образом, произошло 100% увеличение числа смертей от СПИДа в сравнении с 2015 г. при снижении общего показателя смертности на 1,43%.

Кроме того, определено, что в 2016 г. в филиалах ФКУЗ МСЧ-23 ФСИН России на 52,6% увеличилось число ВИЧ-инфицированных, состоящих на диспансерном учете. В настоящее время их число составило 621 человек.

Немаловажно, что число лиц, получающих антиретровирусную терапию (АРВТ), согласно клиническому протоколу «Национальные рекомендации по диспансерному наблюдению и лечению больных ВИЧ-инфекцией», клинических и иммунологических показаний, заключения врача-инфекциониста увеличилось на 32,9% и составило 26% от общего числа.

Данные внутриведомственных проверок, проведенных сотрудниками федерального казенного учреждения здравоохранения «Медико-санитарная часть № 23 Федеральной службы исполнения наказаний» с нашим участием и управления организации медико-санитарного обеспечения Федеральной службы исполнения наказаний показали, что значительный поток ВИЧ-инфицированных, пребывающих в уголовно-исполнительные учреждения Краснодарского края и Республики Адыгея и убывающих в течение короткого времени в другие территориальные органы, не позволяет в полной мере контролировать прием, назначенных АРВТ-препаратов, и использовать данные, выполненных диагностических исследований. Это свидетельствует о необходимости создания на базе программно-технического комплекса автоматизированного картотечного учета спецконтингента единой системы автоматизированного электронного документооборота медицинской документации между всеми медико-санитарными частями федеральной службы исполнения наказаний, что позволило бы не только снизить затраты на лекарственное обеспечение ВИЧ-инфицированных, ввиду необоснованного назначения АРВТ-препаратов, но и снизить число больных с выраженной лекарственной устойчивостью.

До настоящего времени остается нерешенным вопрос о проведении всем вновь выявленным ВИЧ-инфицированным в рамках комплексного иммунологического обследования исследования аллели 5701 локуса В – главного комплекса гистосовместимости человека (HLA В*5701) для определения реакции гиперчувствительности к абакавиру, что позволило бы снизить количество денежных затрат на лекарственные препараты при их необоснованном применении.

Одной из немаловажных проблем остается отказ обвиняемых, подсудимых и осужденных от при-

ема АРВТ-препаратов отечественных производителей ввиду отсутствия у спецконтингента информации о российских аналогах широко известных зарубежных лекарственных препаратов. Поэтому необходимо постоянное представление фармацевтическими работниками информации о наличии лекарственных препаратов в аптеке учреждения и возможности их синонимической замены для врачей-специалистов, ответственных за работу с ВИЧ-инфицированными.

Анализ финансового обеспечения МО показал, что в 2016 г. финансирование было увеличено. При этом возросли расходы по статьям «Прочие услуги (лицензирование и обучение медицинских работников)» на 370,52% и «Услуги по содержанию имущества (ремонт и обслуживание медицинской техники)» на 362,33%. Однако на медицинское обеспечение поступило только 9,01% денежных средств, а расходы на приобретение лекарственных средств составили 56,61% от этой суммы.

В ходе исследования было установлено, что по состоянию на начало 2017 г. в филиалах ФКУЗ МСЧ-23 ФСИН России находились лекарственные препараты и медицинские изделия на сумму более 92 млн. рублей.

Определено, что в 2016 г. в медицинской организации использовались 16 международных непатентованных наименований (МНН) ЛП и 23 торговых наименования (ТН) АРВТ – препаратов из 81 ТН, зарегистрированных на территории Российской Федерации без учета форм выпуска и дозировок.

Вместе с тем, в учреждениях УИС используется только 5 классов АРВТ лекарственных препаратов из 10 классов, представленных на российском фармацевтическом рынке. Наибольшее количество лекарственных препаратов, используемых в пенитенциарной медицинской организации для проведения АРВТ-терапии, относится к классам «Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы» (НИОТ/NRTI) – 8 МНН, представленных 13 ТН и «Ингибиторы протеазы» – 5 МНН, включающих 6 ТН, что обусловлено применением данных лекарственных средств в предпочтительных схемах лечения 1-го ряда ВИЧ-инфицированных. Остальные классы АРВТ лекарственных препаратов представлены только одним МНН (ралтегравир, энфувиртид, этравирин), вследствие их использования в качестве препаратов резерва.

Анализ форм выпуска используемых ЛП показал, что все торговые наименования препаратов представлены в ассортименте медицинской организации в лекарственной форме для перорального применения, и лишь одно наименование ЛП (фузеон) может использоваться для парентерального (внутривенного) введения. Наибольшее количество торговых наименований ЛС представлено в виде таблеток (17 наименований или 68%), в виде капсул выпускается 6 наименований или 24%, в виде раствора для инфузий и раствора для приема внутрь по 1 наименованию или по 4%.

Установлено, что наибольшее количество лекарственных препаратов в единицах измерения, постав-

ленных в 2016 г. в МО, приходится на комбинацию зидовудина с ламивудином (ТН дизаверокс и зилакомб) 2845 упаковок и ламивудин (ТН амивирен в дозировках 150 мг и 300 мг) 1910 и 534 упаковки соответственно. При анализе стоимости лекарственных препаратов, установлено, что наибольшая стоимость одной таблетки – 220,54 руб. у ЛП ралтегравир (исентресс 400 мг), а наименьшая у ЛП ламивудин (амивирен 150 мг) – 3,96 руб. Однако, цена одной таблетки амивирена в дозировке 300 мг выше в 4 раза и составляет 16,23 руб. Наибольшее количество денежных средств, использованных на закупку АРВТ для МО в 2016 г., было затрачено на ЛП МНН дарунавир (24%) и зидовудин (11%), а наименьшее на невирапин и комбинацию лопинавира с ритонавиром (менее 1%).

В ходе анализа товарных остатков определено, что большинство наименований АРВТ ЛП, применяемых в МО – 58% российского производства. На долю импортных ЛП приходится 42%. Среди них наибольший удельный вес (15%) занимают ЛП производства Индии; по 8% приходится на ЛП, выпускаемые в Италии и США; 7% ЛП производятся в Великобритании и 4% – в Германии.

Анализ учетных документов показал, что в 2016 г. наиболее востребованными оказались ЛП из класса нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, которые в количественном отношении составили 58% от израсходованных в МО. Ингибиторы про-

теазы составили 12%, комбинированные ингибиторы протеазы – 13%, ингибиторы интегразы – 11%, комбинированные ингибиторы интегразы – 6%. При этом наиболее часто используемыми ЛП оказались Олитид, таблетки 300 мг; Калетра, таблетки 200 мг+50 мг, и Амивирен, таблетки 150 мг.

Необходимо подчеркнуть, что в настоящее время обеспеченность лекарственными препаратами для проведения АРВТ ВИЧ-инфицированных и лечения больных туберкулезом составляет 100%, что обусловлено поступлением этих препаратов в рамках централизованного снабжения. Вместе с тем, обеспеченность прочими лекарственными препаратами составляет только 95%, а их запаса хватило лишь до конца первого квартала 2017 г. Приведенные сведения подчеркивают необходимость увеличения финансирования пенитенциарных МО.

В ходе анализа учетных бухгалтерских документов (оборотные ведомости, приходные ордера) установлено, что в 2016 г. в МО поступило ЛП для лечения ВИЧ-инфекции, туберкулеза, гепатита С на сумму 67 млн. рублей. Детальный анализ учетной документации (журнал учета операций расчетов с поставщиками и подрядчиками, отчеты о движении лекарственных средств) позволил выявить основных поставщиков лекарственных препаратов и определить их структуру при централизованных поставках в МО (рис. 1).

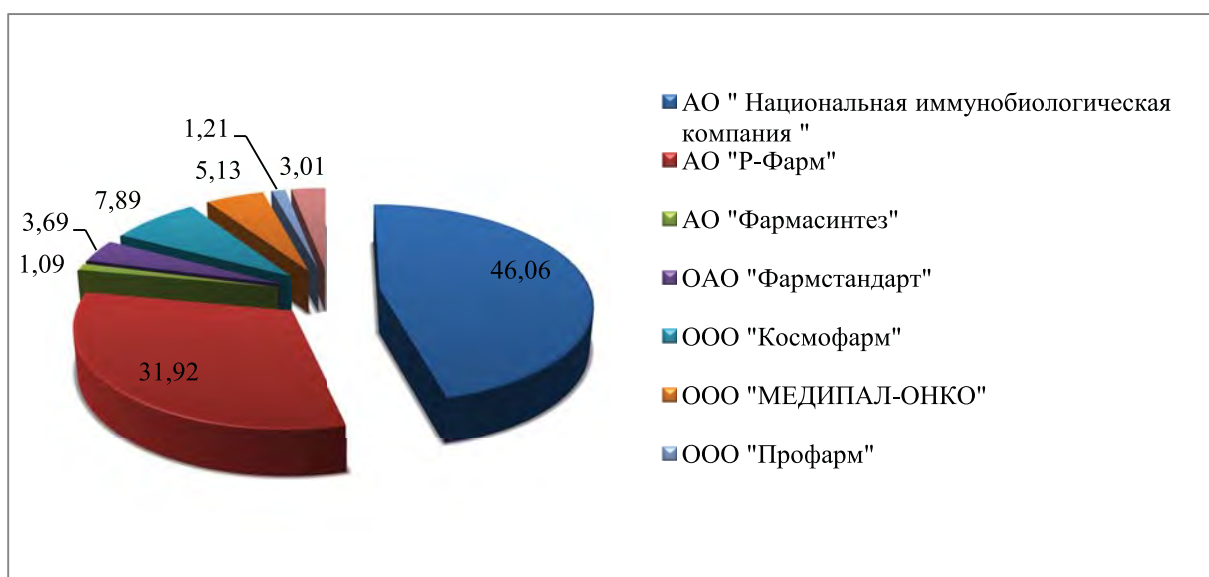


Рисунок 1 – Структура централизованных поставок лекарственных препаратов в медицинскую организацию в 2016 г., %

Как показано на рисунке 1, наибольшее количество лекарственных препаратов для лечения ВИЧ-инфекции, туберкулеза, гепатита С в 2016 г. было поставлено АО «Национальная иммунобиологическая компания» (46,06%) и АО «Р-Фарм» (31,92%), а наименьшее – ООО «Профарм» (1,09%).

Стоит отметить, что в 2016 г. в ФКУЗ МСЧ-23

ФСИН России в рамках государственных поставок Министерства здравоохранения и внутриведомственного перемещения поступило 5 классов антиретровирусных лекарственных препаратов. Из них 57% составили нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ/NRTI), 25% нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы в комбинация, 16% ингибиторы протеазы (ИП/PIs), ингибиторы ин-

тегразы и комбинированные ингибиторы протеазы составили 2% от поставок.

Для рационального формирования ассортимента и товарного остатка АРВТ препаратов пенитенциарной медицинской организации необходимо учитывать не только потребность прошлых лет, но и количество больных, получающих определенные схемы лечения.

Одной из немаловажных проблем остается материально-техническая база аптек филиалов и состояние помещений, занимаемых аптеками. Установлено, что ФКУЗ МСЧ-23 ФСИН России занимает помещения в учреждениях УИС Краснодарского края и Республики Адыгея в соответствии с правом безвозмездной аренды, предусматривающей возложение обязанностей по поддержанию помещений в рабочем состоянии и проведению ремонтов непосредственно на уголовно-исполнительные учреждения. Однако учреждения УИС не имеют финансовых средств на данные мероприятия в соответствии с требованиями нормативной документации. Это приводит к случаям нарушения правил хранения лекарственных препаратов в материальных комнатах аптек.

В последние годы отмечается острая необходимость создания в структуре ФКУЗ МСЧ-23 ФСИН России центральной аптечной организации, со строительством типовых помещений, соответствующих действующему законодательству для хранения и распределения ЛП и медицинских изделий по филиалам медицинской организации.

Таким образом, в ходе исследования выявлены основные проблемы в обеспечении лекарственными препаратами ВИЧ-инфицированных лиц в пенитенциарных учреждениях, требующие первоочередного решения:

Лекарственные препараты для лечения социально-значимых инфекционных заболеваний поставляются в УИС в рамках централизованных поставок, однако в настоящее время в УИС Кубани используются только 5 классов АРВТ ЛП из 10 классов, представленных на отечественном фармацевтическом рынке, ввиду недостаточности финансирования имеется острый дефицит ЛП для лечения оппортунистических инфекций.

Допускаются существенные ошибки и неточности при ведении медицинской документации. Так, не указываются дозировки и кратности приема ЛП, назначенных согласно схемам лечения ВИЧ-инфицированных.

Отсутствует единая система компьютерного учета ЛП и медицинских изделий, что затрудняет оперативную работу по учету материальных запасов ме-

дицинской организации и их перераспределения по филиалам.

Несвоевременно информируются врачи-специалисты о номенклатуре лекарственных препаратов в аптеке, и поэтому у спецконтингента отсутствует информация об отечественных аналогах широко известных зарубежных лекарственных препаратов.

Материально-техническая база аптек не в полной мере обеспечивает сохранность ЛП с учетом нормативной документации.

Отсутствует центральная аптечная организация территориального органа УИС.

Отмечается недостаточность финансирования на оказание своевременной и качественной лекарственной терапии ВИЧ-инфицированных лиц в пенитенциарных учреждениях.

Для решения обозначенных проблем, по нашему мнению, следует использовать следующие пути их решения:

Целесообразно обязательное выполнение при комплексном иммунологическом обследовании исследования гистосовместимости человека (HLA В*5701) для снижения денежных затрат на лекарственные препараты при необоснованном применении.

Необходимо создание на базе программно-технического комплекса автоматизированного картотечного учета спецконтингента единой системы автоматизированного документооборота, медицинской документации между всеми МСЧ ФСИН России для обоснованной лекарственной терапии, ведения медицинской и учетной документации.

Подготовка провизорами аптек УИС на регулярной основе информации о наличии ЛП и возможностях их синонимической замены для врачей специалистов и, опосредованно, для спецконтингента.

Создание центральной аптечной организации территориального органа УИС.

Изыскание дополнительных финансовых средств для улучшения материально-технической базы аптек и лекарственного обеспечения спецконтингента.

Заключение. В настоящее время обусловлена острая необходимость создания в пенитенциарных медицинских организациях центральных аптечных организаций, а также внедрение централизованных систем учета лекарственных препаратов и медицинских изделий, совершенствование процесса ведения медицинской документации и увеличение объемов финансирования на закупку лекарственных препаратов для оказания качественной лекарственной помощи спецконтингенту.

Introduction. Currently, the intensification of HIV infection in Eastern Europe and Central Asia requires efforts to counter the disease and its consequences [1–4]. The feature of this disease is the development of opportunistic diseases among the HIV-infected [5–8]. The struggle against opportunistic infections is one of the major challenges in treating HIV in prison health

care conditions [9–12]. The cases of HIV-infection are associated with tuberculosis and viral hepatitis in the criminal executive system (CES) and account for more than half of the total number of diseases [13]. Hereby HIV reduces the effectiveness of tuberculosis treatment and impacts on its progression [14–17]. In 1991 in the South of Russia the outbreaks of nosocomial HIV

infection were recorded [18]. Most of the HIV-positive in the Russian Federation were men [19, 20]. Most were infected by injecting drugs [19, 21].

The aim of the study is the investigation of the problems in drug supply of HIV-infected people in penitentiary institutions of Krasnodar region and search for their solutions.

Materials and methods. For this investigation were used methods of statistical and system analysis, comparison and grouping of indicators. The materials consisted of reports on activities of Federal state healthcare institution "Medical unit No. 23 of the Federal criminal-executive system" of the Russian Federal for the period of 2015–2016; financial statements; reports on the morbidity and mortality of the inmates in the regional prison medical organization for 2015–2016; the data of on-site inspections of Healthcare regulation territorial bodies across Krasnodar region and Republic of Adygeya.

Results and discussion. During the course of our investigations we found out that medical care of the suspects, accused and convicted persons, detained in the institutions of the penal correction system of the Krasnodar territory, employees of management of Federal service of execution of punishments (FSEP) of Russia for Krasnodar Krai (KK) and FSEP in Republic of Adygeya (RA) conduct 25 branches of the Federal Treasury Healthcare "Medical unit No. 23 of the Federal criminal-executive system" on the basis of the licenses, issued by the Territorial bodies of Healthcare regulation department on the right of using medical and pharmacological activities, as well as licenses for activities with opiates, psychoactive substances, their precursors, to fostering drugcontaining plants.

It was revealed that the activities of the branches was carried out in accordance with the Charter, legislative and other legal acts, orders of Ministry of justice and Russian Federal penitentiary service, normative acts and orders of the Ministry of healthcare, Ministry of internal Affairs and other Federal Executive bodies, regulations on branches. To prevent the failure in achieving goals set for prison medical organization (MO) all activities are compiled with semi-annual plans approved by the head of the institution.

It is positive, that problems of interaction of "Medical and sanitary unit No. 23 of the Federal criminal executive system" of the Russian FSEP for Krasnodar region and the Federal penitentiary service in the Republic of Adygea are regulated by cooperation agreement. Hereby the organization of branches activities is based on a number of approved commissions dealing with the problems of deaths among the suspected, accused and convicted persons in the institutions, as well as procurement, accounting policies, labor protection, work of the medical commissions, storage, accounting and expending of medicines and medical devices.

It was determined that the duties of the employees are regulated by the job descriptions approved by the head of Federal state healthcare institution "Medical and sanitary unit No. 23 of the Federal criminal executive system" of Russia and signed by the staff. However, the

job descriptions do not fully reflect the characteristics of the work in prison health care organizations, which, in turn, leads to violations of labor discipline. Quality control of medical care in branches is carried out during scheduled and unscheduled inspections conducted by the leadership of Federal state healthcare institution medical unit No. 23 of the Federal penitentiary service of Russia in accordance with the quarterly scheduled visits to the institution curators for the activities, approved by the order of territorial criminal-executive system.

During the investigation it was determined that due to insufficient staffing positions of health workers and lack of medical organizations in the centralized software package for automatization of activities providing health care, both – outpatient and inpatient health workers – do not always indicate complaints, detailed anamnestic data on previous illnesses, injuries, transactions, do not describe the objective status and diagnosis code according to ICD-10 due to their high load.

It should be emphasized that no exact dosage or frequency of medication is indicated, there are only diagnosis and treatment scheme of the patient, as well as the data of laboratory and instrumental studies. It should be noted that the programs established in the branches for accounting drugs and medical devices are not integrated into a single system, which greatly impairs the work with the inventory in MO and does not allow their rapid deployment to branches.

It was established that on 16.01.2017 in Federal state healthcare institution "Medical and sanitary unit No. 23 of the Federal criminal-executive system" of the Russian Federal, penitentiary service was equipped with only 89.6% of posts of medical workers, due to an acute shortage of personnel in the regional market and low wages, compared with the average for the region for these categories of workers.

According to the decree of the Government of the Russian Federation dated 06.02.2004, No. 54 "On medical examination of prisoners, represented to release from serving of punishment in connection with illness", in 2016 there were 95% more released people than in 2014. The main reason for the release of suspects and remand prisoners were HIV infection, diabetes mellitus, pathology of the circulatory system, the consequences of spinal injuries and acute strokes.

According to the analyzed medical reports (Form HIV-23), the number of HIV-infected criminals in institutions of criminal-executive system of Krasnodar region in 2014-2016 is presented in Table 1.

As it can be seen in Table 1, the number of HIV-infected criminals in institutions of criminal-executive system of Krasnodar region increased from 2014 up to 80.6%, indicating the rapid spread of infection in the criminal world. It must be emphasized that HIV in the stage of AIDS was the leading cause of death in 17.39% in prisons of Krasnodar region. Thus, there occurred 100% increase in the number of AIDS-related deaths in comparison with 2015 by reducing the overall mortality rate to 1.43%.

Table 1 – The number of HIV-infected criminals in institutions of criminal-executive system of Krasnodar region

Year	2014		2015		2016	
indicators	The average number of inmates	Number of HIV-infected, %	The average number of inmates	Number of HIV-infected, %	The average number of inmates.	Number of HIV-infected, %
	14980	2.44	14725	2.76	15188	4.09
Identified new cases, %	44.53		50.61		36.55	

Besides, it was determined that in 2016 in branches of Federal state healthcare institution medical unit No. 23 there was a 52.6% increase in the number of HIV-infected, linked to care. Currently, their number amounted to 621 people.

It is important that, according to the clinical Protocol “National guidelines for dispensary observation and treatment of HIV-infected patients”, the number of people receiving antiretroviral therapy (ART), clinical and immunological indications, the conclusions of the Infectious Disease Physician increased by 32.9% and amounted to 26% of the total number.

Internal data audits conducted by the employees of the Federal State health care institution “Medical and sanitary unit No. 23 of the Federal criminal-executive system” with our participation and management of health Federal service of execution of punishments has shown that a significant influx of HIV-infected people staying in the penitentiary institutions of Krasnodar region and Republic of Adygea and departing within a short time in other territorial authorities does not allow the authorities to fully control the prescription of anti-retroviral drugs and to use the data of the performed diagnostic tests.

This demonstrates the necessity for the creation of program-technical complex of automated filing of the inmates account in the integrated system of automated electronic document management of medical records within all health parts of the Federal service of execution of punishments, which would not only reduce the cost of drug coverage for HIV-infected, due to the unreasonable prescription of ART drugs, but also to reduce the number of severe drug-resistant patients.

Still the problem of conducting all newly identified HIV-positive patients is not resolved in the framework of a comprehensive immunological survey of studying 5701 allele of locus-B in major histocompatibility complex in humans (HLA B*5701) to determine a hypersensitivity reaction to abacavir, which would reduce the amount of cash costs on medicines in their unreasonable use.

One of the most important problems is the refusal of accused, remand and convicted prisoners to take ARV drugs of native producers because of the absence of the inmates information about the Russian analogues of well-known foreign pharmaceuticals.

So, it is necessity to give information representing the availability of medicines in pharmacy institutions and their synonymic replacement. It should be done by pharmaceutical professionals or medical specialists, responsible for work with HIV-infected people.

The analysis of financial provision of MO showed that in 2016 the funding was increased. With the increased expenditures related to “other services (licensing and training of health workers)” (370.52%) and “Services for the maintenance of the property (repair and maintenance of medical equipment)” (362.33%). But the healthcare provision received only 9.01% cash and the acquisition costs of medicines made up 56.61% of this amount.

During the investigation it was found out that at the beginning of 2017 in the branches of the Federal State health care “Medical and sanitary unit No. 23 of the Federal criminal-executive system” there were medicines and medical products for over 92 million rubles.

It was determined that in 2016 in the medical organization there were used 16 nonproprietary names and 23 commercial names of ARV drugs from 81 trade names registered on the territory of the Russian Federation without taking into account the forms of production and dosages. However, in prisons only 5 classes of ART drugs of the 10 classes represented on the Russian pharmaceutical market are used. The greatest number of drugs used in prison health care organizations to conduct ART therapy are classified as “Nucleoside reverse transcriptase inhibitors” (NNRTI/NRTI) – 8 INN, 13 TN and “Protease Inhibitors” – 5 INN with 6 TN, due to the use of these medicines in the preferred regimens of the 1st range of HIV-infected patients. The other classes of ART drugs are represented by only one MNN (raltegravir, enfuvirtide, etravirine), due to their use as drugs of reserve.

The analysis of the forms of production used by the PL showed that all trade names of drugs are available in the range of medical organizations in the pharmaceutical form for oral taking, and only one name, PL (fusion) can be used for parenteral (intravenous) injections.

The largest number of trade names of drugs are presented in the form of tablets (17 titles, or 68%); 6 titles, or 24% are produced in the form of capsules, in the form of solution for infusion – 1 title and 1 in the form of solution 1 for oral administration, or 4% each form.

It was established that the greatest number of drugs in the units set in 2016 in MO, is a combination of zidovudine with lamivudine (TN disaperes and silacomb) – 2845 packages, and lamivudine (TN leveren in dosages of 150 mg and 300 mg) – 1910 and 534 packages, respectively.

When analyzing the cost of drugs, it was found out that the greatest cost of one tablet is – 220.54 RUB, PL raltegravir (400 mg Isentress) and the smallest cost is that

of lamivudine (150 mg leveren) – 3.96 RUB. However, the price of one pill of emivirine at the dosage of 300 mg is up to 4 times higher and it is 16,23 RUB. The Greatest amount of cash used for the purchase of ARVs for MO in 2016 was spent on the medicinal preparations of INN darunavir – 24% and ZDV – 11%, and the lowest for nevirapine and the combination of lopinavir with ritonavir (less than 1%).

During the analysis of the inventory it was determined that most types of ART medicinal preparations used in MO – 58% – are of Russian production. The share of imported PL is 42%. Among them, the largest share (15%) are LP made in India; 8% are produced in Italy and the United States; 7% are produced in the UK and 4% in Germany.

The analysis of records showed that in 2016 the most popular medicinal preparation from the class of nucleoside reverse transcriptase inhibitors, which are quantitatively accounted for 58% of the spent in MO protease inhibitors accounted for 12%, a combination of protease inhibitors was 13%, integrase inhibitors

accounted for 11%, combined integrase inhibitors – 6%. The most frequently used medicinal preparations were Olitid, tablets 300 mg; Kaletra, tablets 200mg+50mg, and Amuirin, tablets 150 mg.

It should be emphasized that currently, the availability of medicines for antiretroviral treatment of HIV-infected and TB patients is 100% due to the receipt of these products under centralized supply. However, the availability of other drugs is only 95%, and their stock is enough only until the end of the first quarter of 2017. This data emphasizes the necessity of increasing funding for prison MO.

In the analysis of accounting documents (balance sheet, receipt voucher) it was found out that in 2016 in MO drugs used for treatment of HIV infection, tuberculosis, hepatitis C, the cost was \$ 67 million.

A detailed analysis of the records (the log records of transactions settlements with suppliers and contractors, reports on the movement of medicines) allowed to identify the main suppliers of medicines and to determine their structure when delivered centralized in MO (Fig. 1).

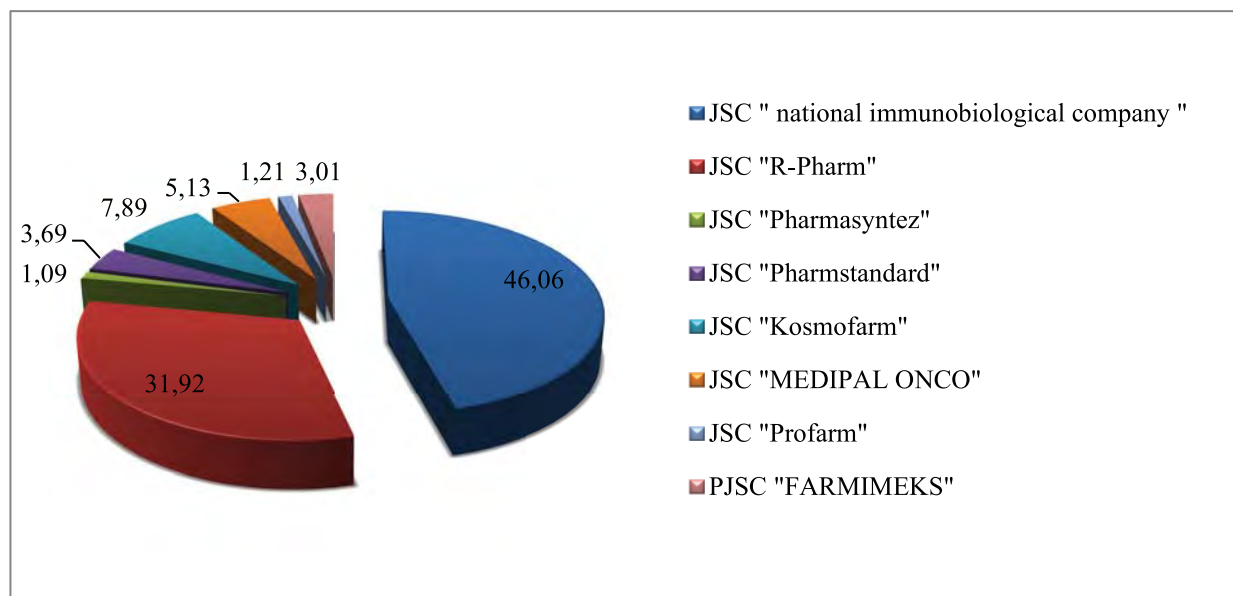


Figure 1 – Structure of the centralized medical supplies in 2016, %

As shown in Figure 1, the largest number of drugs for treatment of HIV infection, tuberculosis, hepatitis C in 2016. it were delivered by JSC “National immunobiological company” (46.06%) and JSC “R-Pharm” (31.92%) and the least – by JSC “Profarm” (1.09%).

It should be noted that in 2016 in the Federal State health care “Medical and sanitary unit No. 23 of the Federal criminal-executive system” of Russia in the framework of public procurement of the Ministry of health and internal displacement 5 classes of antiretroviral drugs were delivered. 57% of these were nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI/ NRTI), 25% of nucleoside reverse transcriptase inhibitors were in combination, 16% of protease inhibitors (PI/ PIs), integrase inhibitors and a combination of protease inhibitors was 2% of the supply.

For the rational formation of assortment and commodity balance of ART drugs in prison health care organizations it is necessary to consider not only the demand of previous years, but the number of patients receiving certain regimens.

One of the most important problems remains the material and technical base of pharmacies of branches, the state of healthcare institutions and premises occupied by medical units.

It was established that the Federal State health care institution “Medical and sanitary unit No. 23 of the Federal criminal-executive system” of Russia occupies the premises in prisons in Krasnodar region and Republic of Adygea in accordance with the laws of the lease, providing for the imposition of duties to maintain the premises in good order and repair directly to prison.

But criminal-executive agencies, however, do not have financial resources for these activities in accordance with regulatory requirements. This leads to cases of infringement of rules of storage of medicines in the material rooms of pharmacies.

In recent years there has been an acute necessity to establish a Central pharmacy organization in Unit 23 with the construction of the model spaces that comply with current legislation for the storage and distribution of pharmaceuticals and medical products for the medical branches of the organization.

Thus, our study has identified the main problems in providing drugs to HIV-infected criminals in penitentiary institutions that require urgent solutions:

The drugs used for treatment of socially significant infectious diseases are delivered in prisons under central supply, however, currently, Kuban UIS Penal Enforcement System uses only 5 classes of ART medicinal preparations out of the 10 classes represented in the native pharmaceutical market, due to lack of funding, there is an acute shortage of drugs for opportunistic infections.

There are significant errors and inaccuracies made in medical records. So, they do not specify the dosage and frequency reception of medicinal preparations assigned according to the treatment regimens of HIV-infected people.

There is no integrated computer accounting system of pharmaceuticals and medical devices, which complicates the operational work of accounting material stocks of medical organizations and their redistribution to the branches.

Late informing of medical specialists about the range of medicines in a drugstore and, therefore, they lack information about native analogues of well-known foreign pharmaceuticals.

Materials and technical base of pharmacies do not fully ensure the safety of medicinal preparations, given by the normative documentation.

Lack of Central pharmacy on the territorial body of UIS Penal Enforcement System. There is a lack of funding for the provision of timely and quality medical treatment for HIV infected persons in penitentiary institutions.

To solve these problems we offer the following:

It is advisable to conduct a mandatory compliance with comprehensive immunological survey research of human histocompatibility (HLA B*5701) to reduce the cash cost of drugs in case of unreasonable use.

It is necessary to create an integrated system of electronic document management, medical records among all medical units of the Federal penitentiary service of Russia for reasonable drug therapy, management of medical and accounting documentation on the basis of program-technical complex for automated filing of the account of inmates.

Preparing information on the availability of medicinal preparations and synonymic replacements for doctors and, indirectly, for the special contingent by pharmacists for pharmacies UIS on a regular basis.

The establishment of the Central pharmacy of the territorial body of UIS Penal Enforcement System.

Finding additional funds to improve the material-technical base of pharmacies and drug supply of inmates.

Conclusion. Currently due to an urgent need of organizing penitentiary medical institutions of the Central medical organizations, and introduction of centralized systems of accounting of pharmaceuticals and medical devices, improving the process of medical records and increase in funding for purchasing medicines for the provision of quality pharmaceutical care to the inmates.

Библиографический список

1. Глобальный доклад ЮНЭЙДС по ВИЧ, 2015. URL: <http://www.unaids.org/ru/resources/publications> (дата обращения: 15.07.2017)
2. Морозова Т.И., Салина Т.Ю. Особенности диагностики туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией / 4-я конф. по вопросам ВИЧ/СПИДа в Восточной Европе и Центральной Азии: Тезисы докл. 4-й конф. М., 2014. С. 62.
3. Справка «ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31.12.2015 года». М.: Федеральный научно-методический Центр по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016. 4 с.
4. Беляков Н.А., Рахманова А.Г. Вирус иммунодефицита человека. СПб. 2010. 141 с.
5. Кожевникова Г.М., Серова В.В., Бобкова М.Р., Деткова Н.В. Вирусные гепатиты В и С у потребителей психотропных препаратов, вводимых парентерально // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2000. №4. С. 49–53.
6. Покровский В.В., Ермак Т.Н., Беляева В.В., Юрин О.Г. ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика и лечение. М., Медицина, 2000, 492 с.
7. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIVInfected adults and adolescents. Recommendations from CDC, the national institutes of health, and the HIV medicine association of the infectious diseases society of America // MMWR. 2009. 10 (58) (RR04). P. 1–198.
8. Копанев Ю.А. Оппортунистические инфекции у детей // Практика педиатра. 2011. №2. С. 10–15.
9. Кабакова Т.И., Калинин И.В. Анализ основных проблем лекарственной помощи ВИЧ-инфицированным в уголовно-исполнительной системе Краснодарского края и Республики Адыгея // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 5. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22889> (дата обращения: 26.01.2017).
10. Вирус иммунодефицита человека – медицина / под ред. Н.А. Белякова и А.Г. Рахмановой. 2-е изд. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2011. 656 с.
11. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Беляева В.В., Ермак Т.Н., Канестри В.Г., Шахгильдян В.И.,

- Козырина Н.В., Буравцова В.В., Нарсия Р.С., Хохлова О.Н., Покровская А.В., Ефремова О.С., Коннов В.В., Куимова У.А., Попова А.А. Национальные рекомендации по диспансерному наблюдению и лечению больных ВИЧ-инфекцией. Клинический протокол // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015. № 6, приложение.
12. Леонова О.Н., Степанова Е.В., Виноградова Т.Н. Поражение нервной системы у больных с ВИЧ-инфекцией // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2012. № 3. С. 44–51.
 13. Калинин И.В. Изучение особенностей лекарственной помощи ВИЧ-инфицированным в учреждениях уголовно-исполнительной системы Краснодарского края и Республики Адыгея // Аспирант. 2015. №9. С. 6–9.
 14. Ван Гемерт У., Юрасова Е. Мероприятия, реализуемые ВОЗ по борьбе с туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией: Бюллетень ВОЗ // Пробл. туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией. 2008. № 5. С. 25.
 15. Харрис Э.Д., Махер Д., Грэхем С. ТБ/ВИЧ: клиническое руководство. ВОЗ, 2008. 2 изд. 34 с.
 16. Networking for policy change: TB/HIV participants guide. World health organization. The Stop TB Strategy. 2010. P. 23.
 17. Ситникова С.В., Мордык А.В., Иванова О.Г. Влияние ВИЧ-инфекции на результаты стационарного курса лечения больных с ассоциированной патологией туберкулез/ВИЧ-инфекция // Туберкулез и болезни легких. 2015. № 7. С. 128–129.
 18. Саухат С.Р., Тормозова Н.М., Рабинович В.Д. ВИЧ-инфекция в Ростовской области // Эпидемиология и инфекционные болезни. 1998. № 5. С. 15–17.
 19. Бондаренко А.Л., Тихомолова Е.Г., Широнова Н.Л. Динамика эпидпроцесса ВИЧ-инфекции в Кировской области // Вятский медицинский вестник. 2003. № 1. С. 16–19.
 20. Справка ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2016 г. // Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. 5 с.
 21. Антонова Т.В., Широнова Н.Л., Гавришева Н.А., Сесь Т.П. Уровень фактора некроза опухолей- α и трансформирующего фактора роста- β в субклинической фазе хронического гепатита С // Медицинская иммунология. 2007. Т. 9. № 4–5. С. 499–504.

References

1. Globalnyj doklad YUNEJDS po VICH [Global report UNAIDS on HIV], 2015 [Internet]. [cited 2017 Jul 15]. Available from: <http://www.unaids.org/ru/resources/publications>. Russian.
2. Morozova TI, Salina TU. Osobennosti diagnostiki tuberkuleza u bolnyh VICH-infekcij [Features of diagnostics of tuberculosis in patients with HIV]. 4th HIV/AIDS in Eastern Europe and Central Asia: Abstracts. 4th Conf. M.: 2014. 62 p. Russian.
3. Spravka VICH-infekciya v Rossijskoj federacii na 31.12.2015 goda [Information “HIV-infection in Russian Federation on 31.12.2015”]. M.: Federal scientific-methodological Center for prevention and control of AIDS Central research Institute Central research Institute of epidemiology of Healthcare regulation state, 2016. 4 p. Russian.
4. Belyakov NA, Rakhmanova AG. Virus immunodeficit cheloveka [The human immunodeficiency virus]. SPb: 2010. 141 p. Russian.
5. Kozhevnikova GM, Serov VV, Bobkova MR, Detkova NIn. Virusnye gepatity V i S u potrebitelej psihotropnyh preparatov vvodimyh parenteralno [Viral hepatitis B and C among consumers of psychotropic drugs administered parenterally]. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2000;4:49–53. Russian.
6. Pokrovsky VV, Ermak TN, Belyaeva VV, Yurin OG. VICH-infekciya klinika diagnostika i lechenie [HIV infection: clinic, diagnosis and treatment]. Moscow, Medicine: 2000. 492 p. Russian.
7. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIVInfected adults and adolescents. Recommendations from CDC, the national institutes of health, and the HIV medicine association of the infectious diseases society of America. MMWR. 2009;10(58) (RR04):1–198.
8. Kopanov YA. Opportunisticheskie infekcii u detej [Opportunistic infections in children]. Praktika pediatri. 2011;2:10–15. Russian.
9. Kabakova TI, Kalinin IV. Analiz osnovnyh problem lekarstvennoj pomoshchi VICH-inficirovannym v ugolovno-ispolnitelnoj sisteme Krasnodarskogo kraja i Respubliki Adygeya [Analysis of the main problems associated with pharmaceutical care for HIV-infected in penitentiary system of the Krasnodar territory and Republic of Adygea]. Modern problems of science and education [Internet]. 2015;5. [cited 2017 Jan 26]. Available from: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22889>. Russian.
10. Belyakov NA, Rakhmanova AG, editors. Virus immunodeficit cheloveka medicina [The human immunodeficiency virus – medicine]. 2nd ed. SPb: Baltic medical education center, 2011. 656 p. Russian.
11. Pokrovsky VV, Yurin OG, Kravchenko AV, Belyaeva VV, Ermak TN, Kanestri VG, Shakhgildyan VI, Kozyrina NV, Buravtsova VV, Nurse RS, Khokhlova ON, Pokrovskaya VA, Efremova OS, Konnov VV, Kuimova UA, Popova AA. Nacionalnye rekomendacii po dispansernomu nablyudeniyu i lecheniyu bolnyh VICH-infekcij Klinicheskij protokol [National recommendations on clinical observation and treatment of patients with HIV infection. Clinical Protocol]. Epidemiology and infectious diseases. 2015;6. Annex. Russian.
12. Leonova ON, Stepanova EV, Vinogradova TN. Porazhenie nervnoj sistemy u bolnyh s VICH-infekcij [The defeat of the nervous system in patients with HIV infection]. Medico-biological and socio-psychological problems in emergency situations. 2012;3:44–51. Russian.
13. Kalinin IV. Izuchenie osobennostej lekarstvennoj pomoshchi VICH-inficirovannym v uchrezhdeniyah ugolov-

- no-ispolnitelnoj sistemy Krasnodarskogo kraja i Respubliki Adygeya [Study of peculiarities of medicinal care for HIV-infected in penitentiary system of the Krasnodar territory and Republic of Adygea]. Aspirant. 2015;9:6–9. Russian.
14. Gemert VU, Yurasova E. Meropriyatiya realizuemye VOZ po borbe s tuberkulezom sochetannym s VICH infekciej Byulleten VOZ [Activities undertaken by World Health Organization to combat TB / HIV co-infection: the Bulletin of World Health Organization]. Probl. tuberculosis in patients with HIV infection. Moscow. 2008;5:25. Russian.
 15. Harries AD, Maher D, Grehem S. TB/VICH klinicheskoe rukovodstvo [TB/HIV: a clinical manual]. 2nd ed. WHO, 2008. 34 p. Russian.
 16. Networking for Policy Change: TB/HIV Participants Guide. World Health Organization. The Stop TB Strategy. 2010. 23 p.
 17. Sitnikova SV, Mordyk AV, Ivanova OG. [Effect of HIV infection on the results of the hospital treatment of patients with associated pathology TB/HIV]. Tuberculosis and lung disease. 2015;7:128–9. Russian.
 18. Saukhat SR, Tormozova NM, Rabinovich VD. VICH-infekciya v Rostovskoj oblasti [HIV infection in the Rostov region]. Epidemiology and infectious diseases. 1998;5:15–7. Russian.
 19. Bondarenko AL, Tikhomolova EG, Shironina NL. Dinamika epidprocessa VICH-infekcii v Kirovskoj oblasti [Dynamics of epidemiological process HIV infection in Kirov region]. Medical newsletter of Vyatka. 2003;1:16–9. Russian.
 20. Spravka VICH-infekciya v Rossijskoj Federacii na 31 dekabrya 2016 g [Certificate of HIV-infection in the Russian Federation on December 31, 2016]. Federalnyj nauchno-metodicheskij centr po profilaktike i borbe so SPI-Dom FBUN Centralnogo NII epidemiologii Rospotrebnadzora [Federal scientific and methodological center for prevention and control of AIDS Central research Institute Central research Institute of epidemiology of Health-care regulation system]. 5 p. Russian.
 21. Antonova TV, Shironina NL, Gavrisheva NA, SES TP. Uroven faktora nekroza opuholej- i transformiruyushchego faktora rosta- v subklinicheskoy faze hronicheskogo gepatita S [The Level of tumor necrosis factor- α and transforming growth factor- β in the subclinical phase of chronic hepatitis C]. Medical immunology (Russia). 2007;9(4–5):499–504. Russian.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы:

Калинин Игорь Викторович – провизор-аналитик филиала «Краевая туберкулезная больница № 1» федерального казенного учреждения здравоохранения «Медико-санитарная часть № 23 Федеральной службы исполнения наказаний». Область научных интересов: системные исследования в области лекарственного обеспечения ВИЧ-инфицированных в медицинских организациях Федеральной службы исполнения наказаний, организация работы аптечных организаций Федеральной службы исполнения наказаний. E-mail: kalinin-i-v@mail.ru.

Кабакова Таисия Ивановна – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры организации и экономики фармации Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: организация лекарственного обеспечения населения при оказании скорой медицинской помощи, системные исследования в области лекарственного обеспечения ВИЧ-инфицированных в медицинских организациях Федеральной службы исполнения наказаний, организация работы аптечных организаций Федеральной службы исполнения наказаний. E-mail: kabtais@mail.ru

Authors:

Kalinin Igor Viktorovich – the pharmacist-analyst of the branch “Regional tuberculosis hospital No. 1” of the Federal Treasury health care institution “Medical and sanitary unit No. 23 of the Federal criminal-executive system”. Research interests: systematic studies in the field of drug supply of HIV-infected criminals in medical institutions of criminal-executive system, organization of work of pharmacies of the Federal service of criminal-executive system. E-mail: kalinin-i-v@mail.ru

Kabakova Taisiya Ivanovna – Doctor of Sciences (Pharmacy), associate Professor, Professor, Department of organization and Economics of pharmacy, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University. Research interests: organization of pharmaceutical provision of the population in the provision of emergency medical care system research in the field of drug provision of HIV-infected criminals in institutions of criminal-executive system. E-mail: kabtais@mail.ru

Поступила в редакцию: 28.07.2017
Отправлена на доработку 16.08.2017
Принята к печати: 14.09.2017

Received: 28.07.2017
Sent back for revision: 16.08.2017
Accepted for publication: 14.09.2017



Scopus



Elsevier, The Netherlands
Scopus Content Selection Advisory Board (CSAB)
Association of Science Editors and Publishers, Russia
Russian Content Selection Advisory Board (RCSAB)

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

GIVEN OUT TO SCIENTIFIC PERIODICAL

Фармация и Фармакология

to confirm the attendance and presentation to the joint Scopus CSAB
and Russian RCAB meeting.

At this meeting, compliance with international standards and selection criteria
of the Scopus database, were discussed by experts of Scopus CSAB and
Russian RCAB. This meeting took place during the 5th International Scientific
and Practical Conference «World-Class Scientific Publication - 2016:
Publishing Ethics, Peer-Review and Content Preparation»
(May 17, 2016 – May 20, 2016)

May 17-20, 2016

RANEPA
Moscow, Russia

K. Holland

Karen Holland
Scopus CSAB Subject Chair



Olga V. Kirillova

Olga V. Kirillova
Russian CSAB Chair, president ASEP



Ассоциация научных редакторов и издателей, Россия
Российский экспертный совет по оценке и продвижению российских
научных журналов в международные информационные системы (РЭС) /
Russian Content Selection Advisory Board (RCSAB)

СЕРТИФИКАТ КАЧЕСТВА

ВЫДАН НАУЧНОМУ ПЕРИОДИЧЕСКОМУ ИЗДАНИЮ

*Фармация
и Фармакология*

в подтверждение соответствия международным стандартам и критериям
информационной системы Scopus. Оценка журнала проведена эксперта-
ми Russian CSAB в период работы Выставки научных журналов участни-
ков 5-ой Международной научно-практической конференции «Научное
издание международного уровня - 2016: решение проблем издательской
этики, рецензирования и подготовки публикаций»
(17-20 мая 2016 г.; РАНХиГС, г. Москва)

Сертификат является рекомендацией к подаче заявки
в базу данных Scopus

17-20 мая 2016 г

РАНХиГС
Россия, г. Москва

Olga V. Kirillova

Ольга В. Кириллова
Председатель РЭС / Russian CSAB,
президент АНРИ



А.Ю. Гаспарян

Член РЭС / Russian CSAB

