

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СТАВРОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

КАСТАРНОВА ЕЛЕНА СЕРГЕЕВНА

**РАЗРАБОТКА И КЛИНИКО-ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА
ЭФФЕКТИВНОСТИ СЕЛЕКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

06.02.01 – Диагностика болезней и терапия животных, патология,
онкология и морфология животных

06.02.03 – Ветеринарная фармакология с токсикологией

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ставропольский государственный аграрный университет»

**Научный
руководитель:**

Оробец Владимир Александрович,
доктор ветеринарных наук, профессор

**Официальные
оппоненты:**

Каложный Иван Исаевич,
доктор ветеринарных наук, профессор
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный
аграрный университет имени Н.И. Вавилова»,
профессор кафедры «Болезни животных и
ветеринарно-санитарная экспертиза»

Медетханов Фазил Акберович,
доктор биологических наук, доцент,
ФГБОУ ВО «Казанская государственная
академия ветеринарной медицины имени
Н.Э. Баумана», зав. кафедрой фармакологии,
токсикологии и радиобиологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

Защита диссертации состоится 11 декабря 2020 г. в 13 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 220.062.02 при ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» по адресу: 355017, Россия, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» <http://www.stgau.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г. и размещен на сайтах: ВАК Минобрнауки и науки РФ: <https://vak.minobrnauki.gov.ru> «___» _____ 2020 г.; ФГБОУ ВО «Ставропольский ГАУ»: <http://www.stgau.ru> «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Дьяченко Юлия Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В современных исследованиях все чаще сообщается об использовании в качестве возможных носителей лекарственных веществ экзосомальных и хитозановых частиц. Основным аргументом в их пользу является отсутствие ксенобиотических и, как следствие, токсичных свойств, они полностью перерабатываются организмом (Batrakova E. V. et al., 2003; Кулакова И. И. с соавт., 2018; Chan H. K., 2011; Свирщевская Е. В. с соавт., 2012; Бакулин А. В. с соавт., 2008).

Использование экзосомальных и хитозановых частиц позволяет изменять фармакокинетику инкорпорированных в них веществ (Batrakova E. V. et al., 2010).

Подробный анализ отечественных и зарубежных литературных источников позволяет судить о пониженном общетоксическом воздействии на организм препаратов с направленной доставкой в сравнении со свободными препаратами (Свирщевская Е. В. с соавт., 2011; Batrakova E. V., 2015; Singh R. et al., 2011; Chan H. K., 2011; Зубарева А. А. с соавт., 2012).

Расширение терапевтической широты за счет снижения общетоксического воздействия на организм позволяет увеличивать дозу без заметных токсических эффектов. В результате возможно получение качественно новых результатов при лечении экзосомальными или хитозановыми препаратами.

Все вышеперечисленное объясняет перспективность разработки способов увеличения биодоступности экзосомальных и хитозановых фармакологических препаратов в комплексной профилактике и лечении заболеваний животных.

Степень разработанности. Большой вклад в изучение вопроса разработки селективных препаратов внесли Е. В. Батракова (2001, 2003, 2007, 2010, 2015), И. И. Кулакова, Г. В. Лисичкин, Р. Ю. Яковлев, Н. Г. Селезнев (2018), Е. И. Каширина (2017), R. Singh (2011), J. Lee (2015).

В зарубежной практике над вопросом разработки и изучения свойств препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц работали Е. V. Batrakova (2007, 2015), Myung Soo Kim (2015), M. J. Haney (2013), L. Alvarez-Erviti, S. Hudson, H. K. Chan (2011), Y. L. Tan, C. G. Liu (2009, 2014), Y. S. Kim, K. Park (2008).

В нашей стране вопросами селективных препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц занимались А. Я. Самуйленко, С. А. Гринь, А. И. Албулов (2018), А. А. Зубарева, В. П. Варламов (2012), В. П. Зубов, (2011, 2012), Т. А. Штамм, С. Б. Ланда, М. В. Филатов (2012).

За последние годы в отечественных и зарубежных публикациях в значительной степени возросло число специальных работ, касающихся разработки и изучения свойств препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц. Однако данных о применении селективных препаратов в ветеринарной медицине в доступной литературе не обнаружено.

Цель исследования. Разработать и провести клинико-терапевтическую оценку эффективности селективных препаратов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать препараты на основе экзосомальных и хитозановых частиц.
2. Изучить токсикологические, аллергенные, раздражающие и пирогенные свойства препаратов «Экзазит» и «Хитазит».

3. Провести оценку клинко-терапевтической эффективности препаратов «Экзазит» и «Хитазит» при острой катаральной бронхопневмонии ягнят.

Научная новизна. Впервые предложено применение в разработке препаратов ветеринарного назначения экзосомальных и хитозановых частиц, обеспечивающих селективность лекарственных средств. Обоснована возможность применения экзосомальных и хитозановых частиц в качестве носителей лекарственных средств. Впервые апробированы селективные препараты на основе экзосомальных и хитозановых частиц, изучены их фармакологические свойства, предложена оптимальная терапевтическая доза и схема применения препаратов «Экзазит» и «Хитазит» при острой катаральной бронхопневмонии ягнят.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в том, что результаты, полученные в ходе исследований, расширяют и дополняют теоретические представления о способах получения, фармако-токсикологических и клинко-терапевтических свойствах селективных препаратов. Научно-практическая значимость работы заключается в разработке способа получения экзосом из крови (патенты РФ 2608509 и 2651521) и лечения ягнят при бронхопневмонии (патент РФ 2731567). Разработанные методы изоляции микровезикул из крови и технология получения лекарственных форм на основе экзосомальных и хитозановых частиц могут служить основой для конструирования селективных препаратов различной направленности. Разработанные селективные препараты могут применяться для лечения ягнят с клиническими проявлениями бронхопневмонии. Результаты исследований могут быть использованы в научно-исследовательской, практической и образовательной деятельности учреждений биологического, ветеринарного, биотехнологического профиля в качестве информации, характеризующей особенности разработки, клинко-терапевтической оценки селективных препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц.

Методология и методы исследования. Методологической основой проведенных исследований является анализ доступных литературных источников, который создает теоретические предпосылки для разработки селективных препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц, оценки их фармако-токсикологических и клинко-терапевтических свойств. Результаты исследований получены посредством клинических, токсикологических, гематологических, морфологических и статистических методов исследований.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Использование векторизированных экзосомальных и хитозановых частиц в качестве носителей для действующих веществ позволяет получить новые лекарственные формы с выраженной селективностью.
2. Препараты «Экзазит» и «Хитазит» безопасны по токсикологическим параметрам, не обладают аллергенными, раздражающими и пирогенными свойствами.
3. Применение при острой катаральной бронхопневмонии ягнят препаратов «Экзазит» и «Хитазит» способствует сокращению периода выздоровления при меньших вводимых дозах действующего вещества.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов работы подтверждена вариационно-статистической обработкой с применением t-критерия Стьюдента в программе «STATISTICA 10» («Stat Soft Inc.», США). Исследования проведены с использованием современных методов на сертифици-

рованном оборудовании. Часть диссертационных исследований была выполнена в рамках реализации федеральной грантовой программы Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере «УМНИК» (договор № 6133ГУ/2015 от 19.06.2015).

Материалы исследований используются в учебном процессе в ФГБОУ ВО «Ставропольский ГАУ», ФГБОУ ВО «Казанская ГАВМ», ФГБОУ ВО «Кубанский ГАУ», ФГБОУ ВО «Южно-Уральский ГАУ».

Основные положения диссертации были представлены, обсуждены и положительно охарактеризованы на Международной научно-практической конференции «Аграрная наука: поиск, проблемы, решения» (Волгоград, 2015), 81-й научно-практической конференции «Молодые аграрии Ставрополя» (Ставрополь 2016), II Международном паразитологическом форуме «Современные проблемы общей и частной паразитологии» (Санкт-Петербург, 2017), Innovative Technologies in Environmental Science and Education (ITESE–2019), XII International Scientific Conference on Agricultural Machinery Industry. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science (2019), 84-й Международной научно-практической конференции «Аграрная наука – Северо-Кавказскому федеральному округу» (Ставрополь, 2019, 2020).

Личный вклад соискателя. Организация и проведение экспериментальной части работы, отбор и анализ проб для исследования, а также статистическая обработка результатов выполнялись лично автором с 2015 по 2020 год. Доля участия соискателя при выполнении работы составляет 85 %.

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе четыре статьи – в изданиях, включенных в библиографическую и реферативную базу данных «Scopus» («Биофармацевтический журнал», E3S Web of Conferences, Innovative Technologies in Environmental Science and Education, XII International Scientific Conference on Agricultural Machinery Industry. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, XIII International Scientific and Practical Conference: State and Prospects for the Development of Agribusiness – Interagromash 2020), три – в изданиях, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени («Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии», «Иппология и ветеринария», «Научная жизнь»). В том числе получено три патента на изобретение № 2608509 от 11.02.2016, № 2651521 от 27.06.2017 и № 2731567 от 11.12.2019, отражающих сущность проведенных исследований.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 143 страницах компьютерного текста. Состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, материалов и методов исследования, результатов исследований, заключения, выводов, практических предложений, списка литературы и 9 приложений. Работа иллюстрирована 25 таблицами и 29 рисунками. Список литературы содержит 250 источников, в том числе 201 иностранных.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе представлены данные научной литературы, отражающие перспективы направленного транспорта лекарственных веществ, токсикологические свойства

систем доставки лекарственных веществ на основе микро- и наночастиц, примеры применения экзосомальных и хитозановых частиц при конструировании фармацевтических композиций и их терапевтической эффективности.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал и методы исследований

Работа выполнялась с 2015 по 2020 год на кафедре терапии и фармакологии, в Научно-диагностическом и лечебно-ветеринарном центре ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», на базе ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», ООО «СХП Новомарьевское», ООО «Николина-Нива».

Объектом исследования являлись селективные лекарственные формы на основе экзосомальных и хитозановых наночастиц, синтезированные на базе ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» и ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет».

Предметом исследования являлась разработка селективных препаратов на основе экзосомальных и хитозановых наночастиц, изучение их токсикологических, аллергенных, раздражающих и пирогенных свойств, оценка клинико-терапевтической эффективности препаратов «Экзазит» и «Хитазит» при острой катаральной бронхопневмонии ягнят.

В процессе диссертационных исследований использовано 540 аутбредных белых мышей, 228 белых аутбредных крыс, 120 морских свинок, 24 кролика породы советская шиншилла, 45 ягнят ставропольской породы.

Разработку препаратов осуществляли совместно с лабораторией биохимии ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» и ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет».

Изучение фармако-токсикологических свойств препаратов «Экзазит» и «Хитазит» на лабораторных животных. Фармако-токсикологическую оценку разработанных препаратов проводили в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Хабриев Р. У., 2005), «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А. Н., 2012), межгосударственными стандартами по изучению токсичности (ГОСТ 32644–2014, ГОСТ 32419–2013, ГОСТ 12.1.007–76, ГОСТ 32296–2013; Roll R. et al., 1989; Diener W. et al., 1994, 1995, 1999), Приказом Минсельхоза России от 06.03.2018 № 101 «Об утверждении правил проведения доклинического исследования лекарственного средства для ветеринарного применения, клинического исследования лекарственного препарата для ветеринарного применения, исследования биоэквивалентности лекарственного препарата для ветеринарного применения» и Правилами лабораторной практики в Российской Федерации, утвержденными 01.04.2016 (Приказ МСХ № 101, Приказ Минздрава № 199н, ГОСТ 33044–2014).

Для изучения фармакокинетических свойств сформировали группы белых аутбредных мышей: 5 групп для препарата «Экзазит» и 5 групп для препарата «Хитазит» (n = 70). Введение препарата внутримышечно в дозе 0,01, 0,03, 0,05, 0,07 и 0,09 мл/кг. Взятие проб плазмы крови и легочной ткани через 30 мин, 1, 3, 6, 12, 24 ч и 2, 3, 4, 5, 8, 11, 14, 18 суток.

Определение острой токсичности препаратов «Экзазит» и «Хитазит» на белых мышах и крысах. Для оценки острой пероральной токсичности использовали белых аутбредных мышей массой 18–22 г и белых аутбредных крыс массой 180–200 г. Формировали опытные и контрольные группы лабораторных животных по 10 особей в каждой (5 самок, 5 самцов). Препараты вводили посредством внутрижелудочного зонда. Период наблюдения составлял 14 суток. Следили за общим состоянием, поведением, приёмом корма и воды, проявлением симптомов интоксикации, возможной гибелью.

Исследование субхронической пероральной токсичности препаратов «Экзазит» и «Хитазит» на белых крысах. Для проведения исследования были сформированы опытные и контрольные группы белых аутбредных крыс по 10 особей в каждой (5 самок, 5 самцов). Препараты «Экзазит» и «Хитазит» вводили посредством внутрижелудочного зонда в течение 14 суток в дозах 811, 405, 162 и 770, 385, 154 мг/кг соответственно (1/10; 1/20 и 1/50 от LD50). В течение всего периода исследований проводили наблюдение за общим состоянием и поведением животных, реакцией на раздражители (звук, свет), проявлением симптомов интоксикации, возможной гибелью. На 1-е сутки после последнего введения препарата 5 крыс из каждой группы подвергли эвтаназии и провели морфологическое и биохимическое исследование крови, патологоанатомическое вскрытие с макроскопическим описанием органов и тканей, определением массовых коэффициентов органов крыс (печень, сердце, селезенка, легкие, почки). Через 10 суток после последнего введения препарата подвергли эвтаназии оставшихся 5 крыс из каждой группы и провели морфологическое и биохимическое исследование крови, патологоанатомическое вскрытие с макроскопическим описанием органов и тканей, определением массовых коэффициентов органов крыс (печень, сердце, селезенка, легкие, почки) для выявления обратимости процессов после многократного внутрижелудочного введения препарата.

Изучение аллергизирующих и раздражающих свойств препаратов «Экзазит» и «Хитазит» на морских свинках. Для изучения аллергического действия при пероральном применении препаратов были сформированы 6 опытных и 6 контрольных групп морских свинок массой 250–300 г ($n = 10$). Подопытных животных сенсибилизировали путем перорального введения препарата ежедневно в течение 30 дней. Тестирование сенсибилизирующих свойств (конъюнктивальная, назальная пробы и НРДТК) проводили на 10, 15 и 30-й день от начала введения препарата. Для постановки пробы 1 каплю препарата вводили под верхнее веко морской свинке, во второй глаз (контрольный) вводили 1 каплю изотонического раствора хлорида натрия. Реакции учитывали через 15 мин (быстрая реакция), через 24 и 48 ч (гиперчувствительность замедленного типа) и оценивали по следующей шкале (в баллах): 1 – легкое покраснение слезного протока; 2 – покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице; 3 – покраснение всей конъюнктивы и склеры.

При постановке назальной пробы в одну половину носа закапывали пипеткой две капли препарата. Если через 10–20 мин после введения появлялись заложенность носа, чихание, водянистые выделения, проба считалась положительной.

Для получения перитонеальных тучных клеток крыс с целью постановки реакции непрямой дегрануляции тучных клеток проводили эвтаназию животных в соответствии с Appendix A of the European Convention for the protection of Vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS N 123) Guidelines

for accommodation and care of animals (Article 5 of the Convention). Белым крысам внутрибрюшинно вводили 5 мл подогретого до 37 °С физиологического раствора, после легкого массажа брюшной стенки в течение 1–2 мин производили разрез до средней линии длиной 1,5–2 см, переворачивали труп разрезом вниз и собирали сыв, стекающий с петель кишечника, в смоченную гепарином пробирку. Препараты готовили на обезжиренных предметных стеклах, окрашенных 0,3 % спиртовым раствором нейтрального красного и высушенных при комнатной температуре. К 0,03 мл взвеси тучных клеток добавляли 0,03 мл сыворотки крови опытного животного и 0,03 мл исследуемой лекарственной формы. Далее препараты покрывали покровным стеклом, края которого смазывали вазелином, затем инкубировали 15 мин в термостате при 37 °С. Препараты микроскопировали под увеличением $\times 20$. Оценку результатов проводили методом подсчёта процента дегранулированных тучных клеток

$$\text{ПДК} = \frac{1a + 2б + 3д}{100},$$

где а, б, д – количество (среднее из трех повторений) дегранулированных клеток соответственно степени дегрануляции (слабо выраженной, умеренной, резкой и степени полностью дегранулированных клеток).

В каждой камере подсчитывали 100 клеток. Реакцию считали положительной, если ПДК (процент дегранулированных тучных клеток) превышал 0,2. При постановке реакции необходимо учитывать следующие контроли: перитонеальной взвеси тучных клеток, аллергена и сыворотки. В контрольных пробах до нужного объема доводили растворителем (фосфатный буфер рН 7,2). Положительным считался тест, если процент дегранулированных клеток превышает 10.

Изучение пирогенных свойств препаратов «Экзазит» и «Хитазит» при внутрибрюшинном введении кроликам. Для изучения пирогенных свойств препаратов использовали половозрелых кроликов породы «Советская шиншилла» весом 4,5–5,0 кг. С этой целью было сформировано шесть опытных и две контрольные группы животных по три головы в каждой. Препараты вводили внутрибрюшинно, однократно. Исходная температура кроликов составляла 38,7–39,2 °С. Раствор испытуемого лекарственного средства вводили животным сразу после второго измерения температуры. Перед введением раствор подогревали до 37 °С. По окончании каждого из этапов испытания определяли максимальное изменение температуры тела каждого кролика по сравнению с исходным значением. Изменение температуры тела животного ниже исходной величины принимали за нулевое и не учитывали. Для трех кроликов определяли сумму индивидуальных максимальных повышений температур, эти значения, полученные на разных этапах испытания, последовательно суммировали, а результаты сравнивали. Лекарственное средство признавали апиrogenным, если полученный результат меньше или равен 1,2 °С, а индивидуальное повышение температуры ни у одного из трех кроликов не превышало 0,5 °С.

Изучение клинко-терапевтической эффективности препаратов «Экзазит» и «Хитазит». Исследование сравнительной клинко-терапевтической эффективности проводили в ООО «СХП Новомарьевское» Шпаковского района Ставропольского края.

Для изучения сравнительной клинко-терапевтической эффективности препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц сформировали три группы ягнят (2,5–3 месяца, $n = 15$) с диагностированной острой катаральной бронхоп-

невмонией. Диагноз поставлен на основании эпизоотической обстановки в хозяйстве, клинических проявлений (осмотра, термометрии, аускультации, перкуссии), морфологических, биохимических и микробиологических исследований.

В качестве антибактериального препарата сравнения в контрольной группе использовали азитронит 10 % в дозе 0,5 мл на 10 кг массы животного трехкратно с интервалом 24 ч. Животным опытных групп внутримышечно применяли антибактериальные препараты на основе экзосомальных и хитозановых частиц в дозе 0,5 мл на 10 кг массы животного однократно. На протяжении всего исследования следили за состоянием животных. На 7, 14 и 21-е сутки исследования производили забор крови из яремной вены для морфобиохимических исследований.

Исследование крови проводили на автоматических анализаторах URIT-3000 Vet Plus (URIT Medical Electronic Co., Ltd., Китай) и ACCENT 200 (Cormay, Польша). Индекс ядерного сдвига нейтрофилов (ИЯСН, индекс Боброва) рассчитывали по формуле

$$\text{ИЯСН} = \frac{A}{B},$$

где А – \sum несегментированных нейтрофилов, %;

В – сегментоядерные нейтрофилы, %.

В процессе анализа полученных морфобиохимических результатов крови молодняка мелкого рогатого скота опирались на материалы современной справочной литературы (Некрасова И. И. с соавт., 2015; Сивкова Т. Н. с соавт., 2017; Бажибина Е. Б. с соавт., 2007; Васильев Ю. Г. с соавт., 2015; Ершов В. И., 2008; Мейер Д. с соавт., 2007; Риган В. Д. с соавт., 2008).

Для подтверждения терапевтической эффективности в сравнительном аспекте проводили гистологическое исследование легочной ткани, взятой по ходу разветвления бронхов из средней (сердечной) доли легкого. Для этого производили диагностический убой перед лечением и после него (по одному животному из каждой группы). При проведении гистологических исследований использовали следующее оборудование: аппарат для проводки и парафиновой инфильтрации Thermo Scientific Exelsior ES (США), станция заливки в парафин Thermo Scientific Microm EC350-1 (США), роторный микротом Thermo Scientific Microtom HM 340 E (США), автоматический мультитейнер Thermo Scientific Varistan Gemini, цифровой микроскоп Olympus BX 45 со встроенным фотоаппаратом С 300 (Япония).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью статистической программы STATISTICA 10 («Stat Soft Inc.», США) с использованием общепринятых методов математической статистики (Плохинский Н. А., 1978, Лакин Г. Ф., 1990). Достоверность полученных во время экспериментов данных рассчитывали посредством t-критерия Стьюдента. Экспериментальный материал, представленный в таблицах, содержит средние значения и их ошибку ($M \pm m$) при выборочной совокупности, соответствующей количеству образцов. Различия считались статистически значимыми с вероятностью не менее 95 % ($p < 0,05$).

2.2. Результаты исследований

В разделе изложены результаты научных исследований, опубликованные в научных статьях и методических рекомендациях самостоятельно и в соавторстве, которые содержат уточненные, расширенные и новые сведения.

2.2.1. Разработка и изучение фармакокинетических свойств селективных препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц

Наночастицы экзосом с включенным азитромицином («Экзазит») получали методом последовательной электропорации и инкубирования. В процессе оптимизации условий получения экзосомальной субстанции разработаны два способа извлечения экзосом из крови, путем ультрацентрифугирования и ультрафильтрации. При проведении электронной микроскопии посредством Carl Zeiss EVO LS 10 в исследуемых образцах экзосом было отмечено присутствие частиц, главным образом сферической и овоидной формы, образующих ассоциаты при высушивании дисперсии. Средний размер частиц составлял $91,36 \pm 15,3$ нм, степень включения препарата 77,4 %.

Наночастицы хитозана с включенным азитромицином (хитазит) получали методом ионной кросс-сшивки по модифицированному методу Calvo et al. (1997). Анализ результатов электронной микроскопии позволяет сделать вывод о том, что основное количество частиц в концентрированных препаратах находится в составе временных ассоциатов с другими частицами, не оказывающих влияния на стабильность показателей качества препарата. Данные проточной цитометрии экспериментальных образцов препаратов, содержащих частицы на основе хитозана с включенным антибиотиком, свидетельствуют об относительной гомогенности полученных дисперсий. Среднее значение размера частиц в препаратах составило $100,41 \pm 50,64$ нм., эффективность включения азитромицина в наночастицы хитозана 86,6 %).

Изучение фармакокинетических свойств препаратов «Экзазит» и «Хитазит» осуществлялось посредством внутримышечного введения препаратов белым мышам. Установлено, что оптимальная терапевтическая концентрация достигалась при введении препаратов в дозе 0,05 мл/кг.

При изучении фармакокинетических свойств установлено, что после однократной внутримышечной инъекции препаратов «Экзазит» и «Хитазит» в дозе 0,05 мл/кг минимальная подавляющая концентрация отмечалась через 0,5 ч, достигая максимального уровня в плазме крови, и сохранялась на протяжении 6 и 8 суток соответственно (рисунок 1).

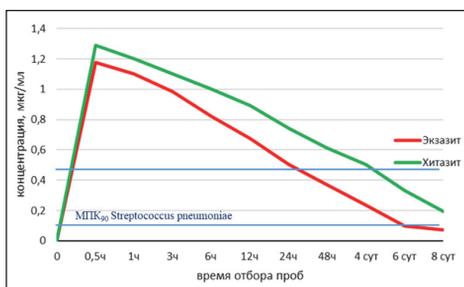


Рисунок 1 – Динамика концентрации препаратов «Экзазит» и «Хитазит» в плазме крови

В легочной ткани минимальная подавляющая концентрация отмечалась через 12 ч, достигая максимального уровня на 5-е сутки, и сохранялась на протяжении 14 суток (рисунок 2). При этом спустя 14 суток после введения препаратов «Экза-

зит» и «Хитазит» их внутрилегочная концентрация составляет 0,823 и 5,823 мкг/г, что намного больше, чем МПК₉₀ для патогенов (в частности МПК₉₀ *S. pneumoniae* составляет 0,12 мкг/мл), что и предопределяет возможность однократного введения препаратов при антибактериальной терапии.

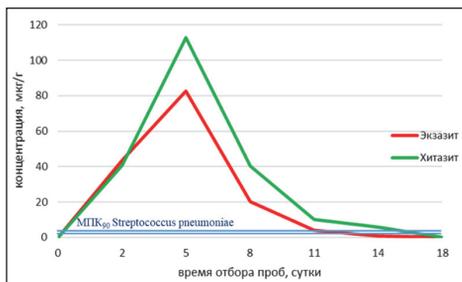


Рисунок 2 – Динамика концентрации препаратов «Экзазит» и «Хитазит» в легочной ткани

Таким образом, разработаны селективные препараты на основе экзосомальных («Экзазит») и хитозановых («Хитазит») наночастиц, установлено, что при введении препаратов «Экзазит» и «Хитазит» максимальная концентрация антибиотика в легочной ткани превышает плазменные показатели в 70 и 91 раз соответственно.

2.2.2. Изучение фармако-токсикологических свойств препаратов «Экзазит» и «Хитазит» на лабораторных животных

2.2.2.1. Определение острой токсичности препарата «Экзазит» на белых мышях и крысах при внутрижелудочном введении

При изучении острой токсичности препарата «Экзазит» установлено, что LD₅₀ при внутрижелудочном введении для белых мышей и крыс составляет 7537±56,76 и 8112±59,99 мг/кг соответственно. Регистрация массы тела животных опытных и контрольной групп до введения препарата, а также на 1, 3, 7, 9 и 14-е сутки не выявила половой чувствительности к препарату при внутрижелудочном введении (таблица 1).

Таблица 1 – Параметры острой токсичности препарата «Экзазит» при внутрижелудочном введении, мг/кг

| Вид животных | Параметр токсичности | | | | | SLD ₅₀ |
|--------------|----------------------|------------------|---------------------------|------------------|----------|-------------------|
| | МПД | LD ₁₆ | LD ₅₀ | LD ₈₄ | LD100 | |
| Белые мыши | 4000 | 6340,3 | 7537 (7480,24–7593,76) | 9743,3 | 10846,45 | ±56,76 |
| Белые крысы | 4000 | 6763,2 | 8112 (8052,01–8171,99) | 10362,4 | 11487,6 | ±59,99 |

Исходя из полученных данных разработанный препарат «Экзазит» по среднесмертельной пероральной дозе по ГОСТ 12.1.007–76 относится к 4-му классу опасности – «Вещества малоопасные».

2.2.2.2. *Определение острой токсичности препарата «Хитазит» на белых мышах и крысах при внутрижелудочном введении*

При изучении острой токсичности препарата «Хитазит» установлено, что LD₅₀ при внутрижелудочном введении для белых мышей и крыс составляет 6982±170,94 и 7705±165,16 мг/кг соответственно. Регистрация массы тела животных опытных и контрольной группы до введения препарата, а также на 1, 3, 7, 9 и 14-е сутки не выявила половой чувствительности к препарату при внутрижелудочном введении (таблица 2).

Таблица 2 – Параметры острой токсичности препарата «Хитазит» при внутрижелудочном введении, мг/кг

| Вид животных | Параметр токсичности | | | | | SLD ₅₀ |
|--------------|----------------------|------------------|---------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | МПД | LD ₁₆ | LD ₅₀ | LD ₈₄ | LD ₁₀₀ | |
| Белые мыши | 4000 | 5845,9 | 6982 (6811,06–7152,94) | 9264,7 | 10406,0 | ±170,94 |
| Белые крысы | 4000 | 6498,4 | 7705 (7539,84–7870,16) | 9801,6 | 10849,9 | ±165,16 |

Исходя из полученных данных разработанный препарат «Хитазит» по среднесмертельной пероральной дозе по ГОСТ 12.1.007–76 относится к 4-му классу опасности – «Вещества малоопасные».

2.2.2.3. *Исследование субхронической пероральной токсичности препаратов «Экзазит» и «Хитазит» на белых крысах*

В результате исследования субхронической пероральной токсичности разработанных препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц на белых аутибредных крысах установлено, что их применение внутрижелудочно один раз в день на протяжении 14 суток в дозах 1/10; 1/20 и 1/50 от LD₅₀ не оказывает влияния на поведенческие реакции животных и их общий вид. Не установлено негативного воздействия на показатели крови и основные физиологические функции организма, отсутствуют патоморфологические изменения, что подтверждает хорошую переносимость препаратов.

2.2.2.4. *Изучение алергизирующих и раздражающих свойств препаратов «Экзазит» и «Хитазит» на морских свинках*

Конъюнктивальная проба сенсibilизированных морских свинок на протяжении всего эксперимента не отличалась от реакции у контрольных животных. Глазная щель не сужалась, также не было отмечено каких-либо изменений сосудистого рисунка конъюнктивы глаз или ее общей гиперемии. При визуальной оценке состояния конъюнктивы, роговицы и век глаз опытных животных установлено, что изучаемые препараты не вызывают раздражения конъюнктивы как сразу после инстилляций, так и на протяжении всего опыта.

При постановке провокационной назальной пробы установлено, что закапывание в носовые ходы испытуемых препаратов сенсibilизированным и контрольным морским свинкам на 10,15 и 30-е сутки не вызывало гиперемии слизистой оболочки, чихания и усиления секреции слизи у животных, поэтому тест оценили как отрицательный.

В результате изучения НРДТК установили, что процент дегранулированных тучных клеток в опытных группах менее 10 (таблица 3). Таким образом, исследование сывороток крови опытных морских свинок после их сенсibilизации показало отсутствие алергизации организма у опытных животных всех групп.

Таблица 3 – Результаты реакции непрямой дегрануляции тучных клеток, %

| Сутки | Группа | |
|---------|-----------|-----------|
| | Опыт | Контроль |
| Экзазит | | |
| 10 | 7,76±1,68 | 7,58±1,48 |
| 15 | 7,48±1,68 | 7,23±1,52 |
| 30 | 7,69±1,80 | 7,69±1,64 |
| Хитазит | | |
| 10 | 7,75±1,24 | 7,85±1,63 |
| 15 | 7,46±1,75 | 7,25±1,25 |
| 30 | 7,24±1,22 | 7,38±1,47 |

* $p \leq 0,05$ – разница статистически достоверна в сравнении с показателями контрольной группы.

В результате изучения алергизирующих свойств препаратов «Экзазит» и «Хитазит» на морских свинках установлено отсутствие алергенного действия, раздражающего конъюнктиву глаза и слизистые оболочки, препараты не вызывают дегрануляции тучных клеток крыс, выходящей за допустимые пределы.

2.2.2.5. Изучение пирогенных свойств препаратов «Экзазит» и «Хитазит» при внутрибрюшинном введении кроликам

В результате изучения пирогенных свойств установили, что сумма повышений температуры у кроликов опытных групп после внутрибрюшинного введения лекарственного препарата составила 0,6–0,8 °С, что в пределах допустимых значений. В связи с тем, что результат меньше 1,2 °С, а индивидуальное повышение температуры не превышало 0,5 °С, препараты «Экзазит» и «Хитазит» могут считаться апилогенными.

2.2.3. Изучение клинико-терапевтической эффективности препаратов «Экзазит» и «Хитазит»

У больных ягнят установлено выраженное общее угнетение, отсутствие аппетита, наличие серозных, серозно-катаральных истечений из носовой полости. Дыхание поверхностное, учащенное – 60–68 дыхательных движений в минуту, одышка инспираторного типа, температура тела достигала 41,2±0,9 °С, отмечался кашель. Повышенной чувствительностью характеризовалась пальпация области гортани и трахеи, сопровождающаяся приступом кашля. Основываясь на вышеперечисленных признаках, предполагали заболевание дыхательной системы. Также у ягнят отмечались усиленное бронхиально-везикулярное дыхание и влажные хрипы при аускультации легких. Очаги притупления при перкуссии области легких были выявлены в верхушечных и сердечных долях. Таким образом, данные клинических исследований ягнят позволяют предположить наличие бронхопневмонии.

Установлен микробный состав экссудата из дыхательных путей больных животных (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycoplasma pneumoniae*).

При изучении морфологической картины крови больных ягнят установили, что количество эритроцитов и гемоглобина составило $6,3-6,6 \times 10^{12}/л$ и $59,9-61,2$ г/л соответственно. Вероятно, снижение этих показателей обусловлено наличием токсинов в крови, угнетением эритропоэза, которые потенцируются гипоксией вследствие развивающейся сердечно-сосудистой недостаточности. Установлено ускорение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) до $1,9-2,2$ мм в час, увеличение количества лейкоцитов до $11,0-11,7 \times 10^9/л$. При умеренном лейкоцитозе отмечали эозинофилию, вероятно связанную с сенсибилизирующим действием микроорганизмов, а также нейтрофильный лейкоцитоз с регенеративным сдвигом ядра влево.

При изучении биохимической картины крови больных ягнят установили, что уровень общего белка увеличился до $83,87-87,93$ г/л, при этом за счёт возрастания численности γ -глобулинов до $52,12-54,83$ % выражен дисбаланс фракционного состава. Уровень кальция снизился до $2,16$ мг%, а щелочной резерв до $217,89-271,57$ мг%, что указывает на метаболический и респираторный ацидоз организма животных.

Таким образом, морфологическим и биохимическим исследованием крови больных ягнят установлено ускорение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) до $1,9-2,2$ мм в час (свидетельствует о катаральном воспалении), нейтрофильный лейкоцитоз с регенеративным сдвигом ядра влево, увеличение количества общего белка и γ -глобулинов, нарушение фосфорно-кальциевого равновесия, сдвиг кислотно-щелочного равновесия в сторону ацидоза. Все вышперечисленное свидетельствует о наличии острого воспалительного процесса.

При микроскопическом изучении средней доли легких установлено, что 75 % легочной ткани в состоянии ателектаза. Повсеместно активная воспалительная лимфоцитарная инфильтрация, особенно вокруг кровеносных сосудов и малых бронхов. Стенка межальвеолярных перегородок утолщена. Регистрируются очаги компенсаторной альвеолярной эмфиземы вследствие разрыва альвеолярных перегородок. В просветах альвеол отмечается скопление оксифильного гомогенного экссудата, что является признаком плазморрагий из капиллярной сети альвеол. Данные картины характеризуют, по нашему мнению, серозную пневмонию. Стенка кровеносных сосудов макро- и микроциркуляторного русла гомогенизирована за счет активной инфильтрации плазмы крови. Наличие застойных явлений в виде плазморрагии и эндотоксемии, по нашему мнению, связано с реакцией эндотелия на интоксикацию, что приводит к воспалительным явлениям стенки сосудов и является следствием тотальной гипоксии. Выраженный зональный лимфоцитарный инфильтрат вокруг бронхов является признаком сенсибилизации и иммунизации организма вследствие воздействия микроорганизмов и интоксикации макроорганизма.

Эпителий средних бронхов находится в состоянии гиперплазии с десквамацией за счет дистрофических некробиотических процессов. Просвет малых бронхов широкий, содержимое отсутствует, эпителий в состоянии атрофии, что является признаком компенсаторных явлений. Терминальные бронхиолы в состоянии обструкции за счет заполнения оксифильной, зернистой массой с десквамацией эпителия и гомогенизацией мышечной оболочки. Единичные малые бронхи без выраженных патологических процессов (рисунок 3).

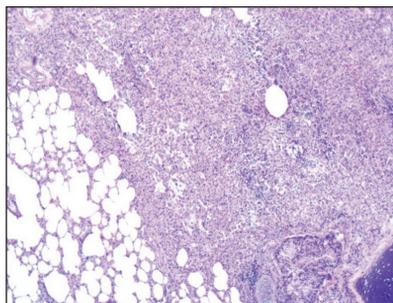


Рисунок 3 – Микроскопическое строение легких до лечения. Очаг серозной пневмонии. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. X100

Основываясь на комплексе клинических, морфологических и биохимических исследований ягнят, установлен диагноз – острая бронхопневмония. Животных с диагностированной острой бронхопневмонией изолировали в отдельном чистом, вентилируемом помещении. Комплексное лечение ягнят основывалось на проведении этиотропной терапии, патогенетической терапии.

В качестве антибактериального компонента использовали антибиотик, эффективный в отношении выявленных возбудителей и активно применяемый в данном хозяйстве – азитромицин.

При антибактериальной терапии препараты вводили внутримышечно согласно схеме, представленной в таблице 4.

Таблица 4 – Схема лечения молодняка мелкого рогатого скота с диагностированной острой бронхопневмонией

| Показатель | Группа 1 (контроль) | Группа 2 | Группа 3 |
|--|---------------------|----------|----------|
| | Азитронит | Экзазит | Хитазит |
| Доза, мл/10 кг | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Расход действующего вещества на курс, мг/10 кг | 150 | 75 | 75 |
| Интервал введения препарата, ч | 24 | – | – |
| Кратность применения препарата, сутки | 3 | 1 | 1 |

Результаты исследования показали, что лечение ягнят с диагностированной острой бронхопневмонией препаратом «Азитронит»-10 % в дозе 0,5 мл/10 кг с интервалом 24 ч на протяжении 3 дней способствовало снижению температуры тела до референсных значений и улучшению общего состояния к концу 3-х – началу 4-х суток. На 4–5-е сутки у ягнят отсутствовали истечения из носовой полости, дыхание стало глубоким, равномерным, везикулярным, без хрипов и очагов притупления в легочной ткани верхушечных и сердечных долей, исчезли одышка и кашель.

Терапия ягнят с диагностированной острой бронхопневмонией препаратом «Экзазит» (группа 2) в дозе 0,5 мл/10 кг однократно способствовало снижению температуры тела до референсных значений и улучшению общего состояния к

3-м суткам. На 5-е сутки у ягнят 2-й группы отсутствовали истечения из носовой полости, дыхание стало глубоким, равномерным, везикулярным, без хрипов и очагов притупления в легочной ткани верхушечных и сердечных долей, исчезли одышка и кашель.

Лечение ягнят с диагностированной острой бронхопневмонией препаратом «Хитазит» (группа 3) в дозе 0,5 мл/10 кг однократно способствовало снижению температуры тела до референсных значений и улучшению общего состояния ко 2–3-м суткам. На 3–5-е сутки у ягнят 3-й группы отсутствовали истечения из носовой полости, дыхание стало глубоким, равномерным, везикулярным, без хрипов и очагов притупления в легочной ткани верхушечных и сердечных долей, исчезли одышка и кашель.

При изучении морфологической картины крови на 7-е сутки установили, что нормализовался уровень эритроцитов и гемоглобина, лейкоцитов, СОЭ и ССК ягнят 2-й и 3-й группы, данные показатели крови животных контрольной группы, несмотря на тенденцию роста, не достигли референсных значений и достоверно от них отличаются. Динамика нормализации процентного содержания эозинофилов, юных, палочкоядерных, сегментоядерных нейтрофилов крови, а также индекс ядерного сдвига нейтрофилов в контрольной группе на 7-е сутки были достоверно ниже показателей опытных групп. Во всех группах было повышено количество моноцитов крови ягнят. К 14-м суткам гематологические показатели крови в контрольной группе соответствовали референсным значениям и достоверно не отличались. В контрольной группе количество нейтрофилов и ИЯСН как на 7-е, так и на 14-е сутки превышало референсные значения.

При терапии острой бронхопневмонии ягнят препаратами «Экзазит» и «Хитазит» на 7-е сутки достоверно повышалось количество лимфоцитов, в то время как в контрольной группе этот показатель повышался лишь на 14-е сутки.

При изучении биохимической картины крови установили, что количество общего белка и γ -глобулинов в опытных группах на 7-е и 14-е сутки было достоверно ниже контроля. Уровень альбуминов и щелочной резерв крови у ягнят опытных групп на 7-е сутки эксперимента достоверно был выше контрольных значений. Данные показатели крови животных 2-й и 3-й группы, несмотря на тенденцию роста, достигли референсных значений к 14-м суткам исследования, а в контрольной группе только к 21-м суткам. На 21-е сутки исследуемые морфологические и биохимические показатели крови в опытной и контрольной группе находились в пределах референсных значений.

При микроскопическом изучении средней доли легких ягнят первой группы после лечения азитронитом установлено фрагментарное очищение от экссудата, однако структурное строение ацинусов слабо просматривается, присутствуют очаги альвеолярной эмфиземы. Отмечается повсеместная лимфоцитарная инфильтрация интерстиция с интерстициальным склерозом соединительной ткани. Эндovasкулит сосудов микроциркуляторного кровеносного русла. Эпителий бронхов находится в состоянии гиперплазии с очаговой десквамацией. Полное разрешение патологического процесса отсутствует, так как имеются крупные фрагменты серозной пневмонии (рисунок 4).

При микроскопическом изучении средней доли легких ягнят второй группы после лечения экзазитом установлено уменьшение очагов ателектаза и серозной жидкости. Просвет бронхов без содержимого. Эпителий в состоянии зональной гиперплазии. Ацинусы тканей легкого отчетливо просматриваются. Однако со-

храняется лимфоцитарная инфильтрация, очаги альвеолярной эмфиземы, эндovasкулит сосудов микроциркуляторного кровеносного русла (артериол, венул), а также очаговое разрастание соединительнотканых волокон интерстиция в межальвеолярных пространствах между сосудами микроциркуляторного русла, что является признаком хронической гипоксии (рисунок 5).

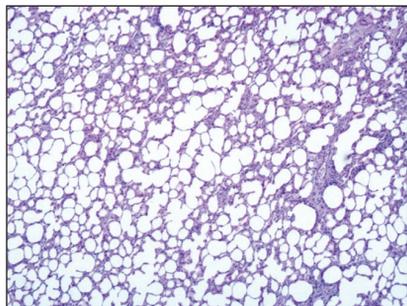


Рисунок 4 – Микроскопическое строение легких после курса комплексной терапии с препаратом «Азитронит» (группа 1).
Окраска гематоксилином и эозином.
Ув. X100

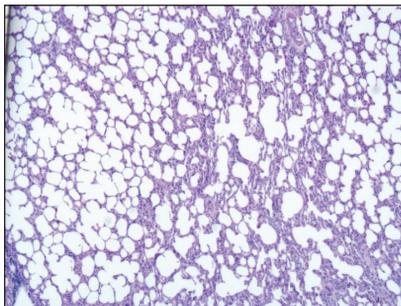


Рисунок 5 – Микроскопическое строение легких после курса комплексной терапии с препаратом «Экзазит» (группа 2).
Окраска гематоксилином и эозином.
Ув. X100

При микроскопическом изучении средней доли легких ягнят третьей группы после лечения установлено, что 95 % альвеол чистые, без содержимого, структурное строение ацинусов отчетливо визуализируется. Просвет бронхов без содержимого. Эпителий без патологических изменений. Местами эпителий бронхов покрыт толстым слоем гомогенной оксифильной массы, что является признаком остаточных явлений разрешения патологического процесса. Вокруг бронхов еще просматривается очаговый лимфоцитарный инфильтрат, что является компенсаторно-приспособительной реакцией в виде формирования структур, имеющих форму лимфоидных фолликулов, указывающей на сенсibilизацию и иммунизацию организма. В единичных сосудах микроциркуляторного кровеносного русла еще просматриваются очаги эндovasкулита с редкими очаговыми лимфоцитарными инфильтратами вокруг сосудов микроциркуляторного русла (артериол, венул) (рисунок 6).

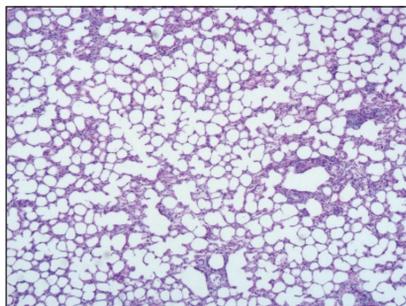


Рисунок 6 – Микроскопическое строение легких после курса комплексной терапии с препаратом «Хитазит» (группа 3).
Окраска гематоксилином и эозином.
Ув. X100

Таким образом, установлено, что течение бронхопневмонии ягнят во второй и третьей группах находится в стадии активного разрешения, которое

характеризуется очищением альвеол, минимизацией очагов альвеолярной эмфиземы, появлением четко структурированных ацинусов, в отличие от животных первой группы, в которой визуализируется фрагментарное очищение от экссудата, слабовыраженное структурное строение ацинусов, присутствуют очаги альвеолярной эмфиземы, повсеместная лимфоцитарная инфильтрация интерстиция с интерстициальным склерозом соединительной ткани, эндovasкулит сосудов микроциркуляторного кровеносного русла, гиперплазия с очаговой десквамацией эпителия бронхов и нет полного разрешения патологического процесса.

При оценке клинико-терапевтической эффективности установлено, что терапия ягнят с диагностированной острой бронхопневмонией препаратами «Экзазит» и «Хитазит» в дозе 0,5 мл/10 кг однократно способствовала снижению температуры тела до значений физиологической нормы и улучшению общего состояния животных на 1–2 суток раньше, чем в контрольной группе. Морфобioхимическая картина крови свидетельствует о достижении референсных значений к 7-м суткам исследования, а в контрольной группе нормализация показателей происходила только к 14–21-м суткам. При изучения гистологической картины средних долей легочной ткани ягнят установлено, что течение бронхопневмонии в группах с применением препаратов «Экзазит» и «Хитазит», в отличие группы с применением «Азитронит», находится в стадии активного разрешения, которое характеризуется очищением альвеол, минимизацией очагов альвеолярной эмфиземы, появлением четко структурированных ацинусов. Таким образом, прослеживается существенное преимущество препаратов «Экзазит» и «Хитазит» в сравнении с препаратом-аналогом, выраженное в сокращении кратности введения антибактериального препарата и сроков лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогресс в области биофармацевтических исследований по созданию лекарств нового поколения с выраженным селективным действием во многом связан с получением принципиально новых лекарственных форм. Очевидно, что для решения таких задач необходим некий носитель с оптимальными свойствами.

Существует множество способов изоляции микровезикул из крови, но все они основаны на использовании дорогостоящего оборудования, реагентов и коммерческих наборов, а также являются длительными и трудоемкими, что затрудняет воспроизводство данных методик в широкой лабораторно-диагностической практике (Looze C., Yui D., Leung L. et al., 2009; Пат. RU 2556825). Проведенные исследования согласуются с данными ведущих ученых, нами разработаны два способа извлечения экзосом из крови, методом ультрацентрифугирования и ультрафильтрации. Так же разработаны два препарата на основе экзосомальных и хитозановых частиц со степенью включения действующего вещества 77,4 и 86,6 % соответственно. Среднее значение размера частиц при этом составило 100 ± 50 нм.

Согласно зарубежным источникам, при правильном подборе направляющего агента возможно контролируемое изменение кинетики действующего вещества (Cánera C. et al., 2017; Huang G. et al., 2017). В процессе выполнения диссертационных исследований установлено, что разработанные препараты «Экзазит» и «Хитазит» обладают селективностью к легочной ткани. При этом спустя 14 суток после однократного введения препаратов «Экзазит» и «Хитазит» их внутрилегочная концентрация составляет 0,823 и 5,823 мкг/г соответственно, что превышает

МПК₉₀ для патогенов (в частности МПК₉₀ *S. pneumoniae* составляет 0,12 мкг/мл), это предопределяет возможность однократного введения препаратов при антибактериальной терапии.

Проведенные нами исследования подтверждают выводы многих авторов об отсутствии токсических свойств как у экзосомальных, так и у хитозановых частиц. Так, при определении острой пероральной токсичности препарата «Экзазит» установлено, что LD₅₀ для белых мышей и крыс составляет 7537±56,76 и 8112±59,99 мг/кг соответственно. Так же установлено, что LD₅₀ препарата «Хитазит» при внутрижелудочном введении препарата для белых мышей и крыс составляет 6982±170,94 и 7705±165,16 мг/кг соответственно. Исходя из полученных данных препараты «Экзазит» и «Хитазит» по среднесмертельной пероральной дозе по ГОСТ 12.1.007–76 относятся к 4-му классу опасности – «Вещества малоопасные».

В результате исследования субхронической пероральной токсичности разработанных препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц на белых аутбредных крысах установлено, что их применение внутривнутрижелудочно один раз в день на протяжении 14 суток в дозах 1/10, 1/20 и 1/50 от LD₅₀ не оказывает влияния на поведенческие реакции животных и их общий вид. Не установлено негативного воздействия на показатели крови и основные физиологические функции организма, отсутствуют патоморфологические изменения, что подтверждает хорошую переносимость препарата.

При изучении алергизирующих свойств препаратов «Экзазит» и «Хитазит» на морских свинках установлено отсутствие пирогенных свойств, алергенного и раздражающего действия на конъюнктиву глаза и слизистые оболочки, дегранулирующего действия на тучные клетки крыс, выходящего за допустимые пределы.

При оценке клинко-терапевтической эффективности установлено, что терапия ягнят с диагностированной острой бронхопневмонией препаратами «Экзазит» и «Хитазит» в дозе 0,5 мл/10 кг однократно способствовала снижению температуры тела до значений физиологической нормы и улучшению общего состояния животных на 1–2 суток раньше, чем в контрольной группе. Морфобioхимическая картина крови свидетельствует о достижении референсных значений к 7-м суткам исследования, а в контрольной группе нормализация показателей происходила только к 14–21-м суткам. При изучения гистологической картины средних долей легочной ткани ягнят установлено, что течение бронхопневмонии в группах с применением препаратов «Экзазит» и «Хитазит», в отличие группы с применением «Азитронит», находится в стадии активного разрешения, которое характеризуется очищением альвеол, минимизацией очагов альвеолярной эмфиземы, появлением четко структурированных ацинусов. Таким образом, прослеживается существенное преимущество препаратов «Экзазит» и «Хитазит» в сравнении с препаратом-аналогом, выраженное в сокращении кратности введения антибактериального препарата и сроков лечения.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны два препарата: на основе экзосом («Экзазит») с размером частиц 91,36±15,3 нм и степенью включения действующего вещества 77,4 % и на основе хитозана («Хитазит») с размером частиц 100,41±50,64 нм и степенью включения действующего вещества 86,6 %.

2. Препарат «Экзазит» согласно ГОСТ 12.1.007–76 по среднесмертельной пероральной дозе относится к 4-му классу опасности – «Вещества малоопасные». LD₅₀ при внутрижелудочном введении экзазита для белых мышей и крыс составила 7537±56,76 и 8112±59,99 мг/кг соответственно. Регистрацией массы тела животных опытных и контрольной группы до введения препарата, а также на 1, 3, 7, 9 и 14-е сутки не выявлено половой чувствительности к препарату при внутрижелудочном введении.
3. Препарат «Хитазит» согласно ГОСТ 12.1.007–76 по среднесмертельной пероральной дозе относится к 4-му классу опасности – «Вещества малоопасные». LD₅₀ при внутрижелудочном введении Экзазита для белых мышей и крыс составила 6982±170,94 и 7705±165,16 мг/кг соответственно. Регистрацией массы тела животных опытных и контрольной группы до введения препарата, а также на 1, 3, 7, 9 и 14-е сутки не выявлено половой чувствительности к препарату при внутрижелудочном введении.
4. Экзазит и хитазит в дозах 811, 405, 162 и 770, 385, 154 мг/кг соответственно не оказывают негативного воздействия на показатели крови и основные физиологические функции организма белых аутбредных крыс, отсутствуют патоморфологические изменения, что подтверждает хорошую переносимость препаратов.
5. Экзазит и хитазит являются апирогенными в связи с тем, что сумма повышений температуры после внутрибрюшинного введения лекарственных препаратов составила 0,6–0,8 °С, а индивидуальное повышение температуры не превышало 0,5.
6. Экзазит и хитазит не обладают аллергенным и раздражающим действием на конъюнктиву глаза и слизистые оболочки, процент дегранулированных тучных клеток в опытных группах < 10, что входит в допустимые пределы.
7. При применении в комплексной терапии ягнят с диагностированной острой бронхопневмонией препаратов «Экзазит» и «Хитазит» установлено, что оптимальной дозой для лечения является 0,5 мл/10 кг, при этом сокращаются сроки лечения и кратность применения антибактериального средства.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Разработанные методы изоляции микровезикул из крови и технология получения лекарственных форм на основе экзосомальных и хитозановых частиц могут служить основой для конструирования селективных препаратов различной направленности.

Результаты исследований могут быть использованы в научно-исследовательской, практической и образовательной деятельности учреждений биологического, ветеринарного, биотехнологического профиля в качестве информации, характеризующей особенности разработки, клинико-терапевтической оценки селективных препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В перспективе дальнейшей разработки темы предполагается совершенствование лекарственной формы селективного препарата «Экзазит» в направлении стабилизации готового препарата, разработки технологии получения экзосом из мезенхимальных клеточных линий, проведение широкого производственного

клинического испытания эффективности полученных препаратов при заболеваниях животных.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ

1. Изучение влияния новой биополимерной наносистемы на показатели крови крыс / Е. С. Кастарнова, В. А. Оробец, О. И. Севостьянова, В. Н. Шахова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2019. – № 1. – С. 140–142.
2. Оробец, В. А. Селективные лекарственные формы препаратов как одно из условий в становлении органического животноводства / В. А. Оробец, Е. С. Кастарнова // Иппология и ветеринария. – № 1 (35). – 2020. – С. 50–51.
3. Кастарнова, Е. С. Аллергизирующие и раздражающие свойства новых селективных препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц / Е. С. Кастарнова, В. А. Оробец // Научная жизнь. – 2020. – Том 15. – № 7. – С. 999–1006. doi: 10.35679/1991-9476-2020-15-7-999-1006.

Публикации в изданиях, индексируемых в Scopus

4. Исследование дисперсий экзосом, полученных методом ультрафильтрации / Е. С. Кастарнова, В. А. Оробец, Д. А. Ковалев и др. // Биофармацевтический журнал. – 2019. – Т. 11. – № 1. – С. 20–23.
5. Clinical and therapeutic efficacy of biodegradable nanostructures in experimental infections / V. Trukhachev, V. Orobets, E. Kastarnova, V. Shakhova // XII International Scientific Conference on Agricultural Machinery Industry. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 403 (2019) 012107. doi:10.1088/1755-1315/403/1/012107.
6. Kastarnova, E. Study of the physicochemical properties of exosome dispersions obtained by ultrafiltration / E.Kastarnova, V. Orobets, V. Shakhova et al. // E3S Web of Conferences, Innovative Technologies in Environmental Science and Education (ITESE-2019), Volume 135 (2019) DOI: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/201913501096>
7. Study of subchronic toxicity of the developed antibacterial drug based on exosomal particles / E. Kastarnova, V. Orobets, V. Shahova et al. // XIII International Scientific and Practical Conference «State and Prospects for the Development of Agribusiness - INTERAGROMASH 2020». – Volume 175, (2020). doi.org/10.1051/e3sconf/202017507002.

Публикации в материалах конференций и других научно-практических изданиях

8. Оробец, В. А. Использование экзосом в качестве терапевтической системы доставки лекарственных средств / В. А. Оробец, Е. С. Кастарнова // Международный научно-исследовательский журнал. – 2015. – № 8-3 (39). – С. 30–33.
9. Кастарнова, Е. С. Экзосомы как средство преодоления биологических барьеров / Е. С. Кастарнова, В. А. Оробец // Аграрная наука: поиск, проблемы,

- решения : материалы Международной научно-практической конференции – Волгоград, 2015. – Том № 2. – С. 228–230.
10. Orobets, V. A. The advantage of exosomes as vectors of drugs / V. A. Orobets, E. S. Kastarnova // *European Journal of Natural History*. – 2015. – № 4. – P. 54–55.
 11. Кастарнова, Е. С. Преимущество экзосом в качестве векторов лекарственных средств / Е. С. Кастарнова // Молодые аграрии Ставрополя : сборник студенческих научных трудов по материалам 81-й научно-практической конференции. – Ставрополь : АГРУС, 2016. – С. 32–33.
 12. Kastarnova, E. S. Negative consequences of using nanoparticles in medicine / E. S. Kastarnova, V. A. Orobets, V. N. Shashova // *International Journal of Applied and Fundamental Research*. – 2016. – № 6 – Режим доступа: www.science-sd.com/468-25202 (08.01.2017).
 13. Кастарнова, Е. С. Перспективы экзосомальных препаратов / Е. С. Кастарнова // Современные проблемы общей и частной паразитологии : материалы II Международного паразитологического форума / Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины; Зоологический институт РАН. – 2017. – С. 123–126.
 14. Кастарнова, Е. С. Терапевтическая оценка биополимерных наносистем / Е. С. Кастарнова // Инновационные технологии в сельском хозяйстве, ветеринарии и пищевой промышленности : материалы 84-й Международной научно-практической конференции «Аграрная наука – Северо-Кавказскому федеральному округу» (г. Ставрополь, 17 мая 2019 г.) – Ставрополь, 2019. – С. 448–450.

Патенты Российской Федерации на изобретение:

15. Пат. 2608509 Российская Федерация, МПК С 12 № 5/00. Способ получения экзосом из крови / Е. С. Кастарнова, В. А. Оробец ; заявитель и патентообладатель Е. С. Кастарнова, В. А. Оробец. – № 2016104722 ; заявл. 11.02.16 ; опубл. 18.01.17, Бюл. № 2.
16. Пат. 2651521 Российская Федерация, МПК С 12 № 5/00. Способ изоляции микровезикул из крови / Е. С. Кастарнова, В. А. Оробец ; заявитель и патентообладатель СтГАУ. – № 2017122918 ; заявл. 27.06.17 ; опубл. 19.04.18, Бюл. № 11.
17. Пат. 2731567 Российская Федерация, МПК А61К 31/00, А61К 47/36, А61Р 31/04, А61Р 11/00. Способ лечения бронхопневмонии / Е. С. Кастарнова, В. А. Оробец, В. Н. Шахова, Д. А. Ковалев, А. М. Жиров; заявитель и патентообладатель СтГАУ. – № 2019141207; заявл. 11.12.2019; опубл. 4.09.2020, Бюл. № 25.

Подписано в печать 06.10.2020. Формат 60x84 $\frac{1}{16}$.
Гарнитура «Таймс». Бумага офсетная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100. Заказ № 219.

Отпечатано в типографии издательско-полиграфического комплекса СтГАУ
«АГРУС», г. Ставрополь, ул. Пушкина, 15.