



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94082 (13) C2

(51) МПК (2011.01)

A61K 36/185 (2006.01)

A61K 36/28 (2006.01)

A61K 36/738 (2006.01)

A61K 41/00

A61P 31/18 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) РОСЛИННИЙ ЕКСТРАКТ З ІМУНОМОДУЛЯТОРНОЮ ДІЄЮ, ОТРИМАНИЙ З *Rosa sp.*, *Urtica dioica*  
ТА *Tanacetum vulgare*

1

2

(21) а200809704

(22) 31.01.2006

(24) 11.04.2011

(86) РСТ/ЕР2006/000820, 31.01.2006

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) НОВІТСЬКИЙ ЮРІЙ АЛЕКСЕВІЧ, RU, МАДАНИ  
ГЕССАМЕДІН, IR, ҐАРІБДОУСТ ФАГАД, IR, ФАГА-  
ДІ МОГАММАД, IR, ФОРСАМФАР БАРДІА, IR, МО-  
ГРАС МІНОО, IR

(73) ПАРСРУС КО., IR

(56) RU 2 191 824 C2, 27.10.2002

RU 2 171 284 C2, 27.07.2001

RU 2 160 596 C1, 20.12.2000

SU 1 169 657 A, 30.07.1985

(57) 1. Спосіб одержання рослинного екстракту,  
який полягає в тому, щоа) застосовують рослинний матеріал, отриманий з  
листя і стебла *Urtica dioica* і *Tanacetum vulgare* та  
плодів *Rosa sp.*;

б) сушать рослинний матеріал;

в) додають органічний розчинник;

г) витримують суміш рослинного матеріалу та ор-  
ганічного розчинника в інкубаторі;

ґ) отримують рослинний екстракт;

д) додають селен та/або його органічну та неоргані-  
чну сіль; та/або

е) додають сечовину та

є) піддають рослинний екстракт дії імпульсного  
електричного поля.2. Спосіб за п.1, в якому імпульс електромагнітно-  
го поля має синусоїдальну, прямокутну та/або сто-  
хастичну форму.3. Спосіб за п.1 або 2, в якому імпульсне електро-  
магнітне поле має частоту приблизно 5-750кГц,  
переважно 50-350кГц, найбільш переважно близь-  
ко 250кГц.4. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в яко-  
му імпульсне електромагнітне поле має потужність  
приблизно 10-200Вт, переважно 20-100Вт, най-  
більш переважно близько 45Вт.5. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в яко-  
му імпульсне електромагнітне поле має напруже-  
ність 100-150мкТ.6. Спосіб за будь-яким з пп.1-5, в якому рослинний  
екстракт піддають дії імпульсного електромагніт-  
ного поля протягом приблизно 2-5 хвилин.7. Спосіб за будь-яким з пп.1-6, в якому рослинний  
екстракт піддають дії імпульсного електромагніт-  
ного поля повторно і переважно три рази.8. Застосування рослинного екстракту, одержаного  
способом за будь-яким з пунктів 1-7, для виготов-  
лення фармацевтичної композиції для лікування  
суб'єкта від ВІЛ-інфекції та/або СНІДу.9. Застосування за п.8, в якому суб'єктом лікуван-  
ня є хребетна тварина, переважно ссавець, най-  
більш переважно людина.10. Застосування за п.8 або 9, в якому суб'єкт лі-  
кування не є вагітним.

Цей винахід стосується способу готування ро-  
слинного екстракту *Rosa sp.*, *Urtica dioica* та/або  
*Tanacetum vulgare*, який переважно полягає у об-  
робці рослинного екстракту імпульсним високочас-  
тотним електромагнітним полем. Винахід також  
стосується рослинного екстракту, приготованого  
таким способом і таким, що необов'язково має в  
своєму складі селен і/або сечовину, і його застосу-  
вання в терапії захворювань, пов'язаних з ослаб-  
ленням імунної системи, переважно ВІЛ-інфекції

та СНІД. Винахід також стосується фармакологіч-  
ної композиції та набору, що містить фармацевти-  
чну композицію.

Синдром набутого імунodefіциту (СНІД) є  
хронічним, небезпечним для життя захворюван-  
ням, яке викликає вірус імунodefіциту людини  
(ВІЧ). Цей ретровірус має два різновиди - ВІЛ-1,  
що викликає СНІД в Західній півкулі та в Європі, та  
ВІЛ-2, що є головною причиною СНІДу в Африці та  
Південно-Східній Азії.

(13) C2

(11) 94082

(19) UA

Більш докладно, СНІД характеризується низкою симптомів, що виявляються на пізніх стадіях ВІЛ-інфекції. Без будь-якого лікування, інкубаційний період, тобто час між проникненням ВІЛ-інфекції в організм і клінічним проявом СНІДу, складає близько 10 років. ВІЛ-інфекція викликає прогресуючу недостатність імунної системи, що врешті призводить до імунодефіциту. Таким чином, найбільш важливими клінічними симптомами СНІДу суть умовно-патогенні інфекції та, крім того, характерні злоякісні новоутворення, наприклад, саркома Капоші, енцефалопатія, асоційована зі СНІДом і виснажливий синдром, асоційований зі СНІДом. Основу імунодефіциту складає зменшення кількості  $CD4^+$  Т-клітин, що мають важливе значення як для клітинного, так і для гуморального імунітету. З часу виникнення епідемії, кількісний аналіз  $CD4^+$  Т-лімфоцитів в циркулюючій крові є критичним методом виявлення і оцінки ВІЛ-інфекції і СНІДу. Частка  $CD4^+$  Т-лімфоцитів у відсотках і їх зміни з часом (зниження) слугують важливими показниками для визначення тяжкості захворювання, прогнозу і терапевтичного спостереження.

Перші випадки СНІДу було зареєстровано на початку вісімдесятих років минулого століття. З того часу СНІД широко розповсюдився по всьому світу і, крім того, в деяких регіонах, особливо в країнах, що розвиваються, досяг розмірів епідемії. На сьогодні ВІЧ-інфіковано приблизно 40 мільйонів чоловік, з них приблизно 2,2 мільйонів дітей. У 2004р. було відмічено близько п'яти мільйонів нових випадків інфікування, і близько 3,1 мільйонів чоловік померли від СНІДу, з них 510000 дітей (за даними Всесвітньої Організації Охорони здоров'я ВОЗ).

З 1995 р кількість препаратів для лікування СНІДу збільшилася втричі. В даний час широкого поширення набула комбінована терапія як найбільш ефективна і така, що супроводжується найменшими побічними ефектами. Розробка нових активних препаратів і ліків, а також терапевтичних схем змогла значно уповільнити прогресування хвороби, надати зворотного розвитку симптомів пізньої стадії захворювання і запобігти зараженню новонароджених від інфікованих матерів. Стандартом стала така звана "високоактивна протиретровірусна терапія" (ВАПРТ), комбінована терапія, що включає три або більш препаратів. Було показано, що ВАПРТ уповільнює прогресування СНІДу і знижує смертність. Як правило, два препарати, включені у ВАПРТ, впливають на зворотну транскриптазу, і один препарат - на вірусну протеазу. Інгібітори зворотної транскриптази, що добре себе зарекомендували, суть аналогами нуклеозидів, серед яких зидовудин (AZT, Retrovir®), ламівудин (Etrivir®) і діданозин (Videx®). Такі інгібітори транскриптази вбудовуються в ланцюжок ДНК, що росте, унаслідок чого блокується її подальший синтез. Відомі інші інгібітори зворотної транскриптази, наприклад, Viramune®, який пригнічує дію ферменту іншими механізмами. Інгібітори протеаз блокують вірусну протеазу, так що білки, необхідні для скупчення нових вірусів, не можуть відщеплюватися від крупнішого білкового попередника. При-

кладами таких ліків суть індинавір (Crixivan®), саквінавір (Invirase®), рітонавір (Norvir®) і нельфінавір мезилат (Viracept®). Мало того, в терапії застосовують такі препарати, як інгібітори злиття, наприклад, ефувіртид (Fuzeon®) та інгібітори інтегрази.

Не зважаючи на значні досягнення в терапії ВІЛ-інфекції та СНІДу, вона ще має деякі недоліки і вади. Препарати, вживані в даний час, вельми дорогі, отже вони не тільки виснажують бюджет багатих країн, але і стають просто недоступними в багатьох бідних країнах, де лютує епідемія. Вони дають багато неприємних побічних ефектів (наприклад, нудота, діарея), а деякі – тяжкі побічні ефекти (наприклад, ураження печінки і підшлункової залози, іноді із смертельним наслідком). Вони вимагають дуже складного режиму дозування, наприклад, призначення більше десяти пігулок на день (не беручи до уваги тих, що необхідні для боротьби з супутніми умовно-патогенними інфекціями). Зрештою, вони часто перестають бути ефективними, оскільки вони викликають появу стійких до ліків віріонів в організмі пацієнта.

Отже, існує потреба в альтернативних, вдосконалених або кращих фармацевтичних засобах, що забезпечують зменшення інтенсивності симптомів СНІДу, сповільнення його проявів і/або корекцію ВІЛ-інфекції. До того ж, існує необхідність в дешевших фармацевтичних засобах.

Таким чином, метою цього винаходу є створення фармакологічно активної композиції для лікування хворих, що страждають на вірусні інфекції та пов'язані з ними симптоми та стани, переважно на ВІЛ-інфекцію та СНІД.

Згідно з винаходом запропоновано спосіб готування рослинного екстракту, який полягає в тому, що

а) застосовують рослинний матеріал, отриманий від *Rosa* sp., *Urtica dioica* та/або *Tanacetum vulgare*;

б) сушать рослинний матеріал;

в) додають органічний розчинник;

г) витримують суміш рослинного матеріалу та органічного розчинника в інкубаторі;

г') отримують рослинний екстракт;

У одному з варіантів рослинний матеріал отримано від *Rosa* sp., *Urtica dioica* і *Tanacetum vulgare*.

В іншому варіанті рослинний матеріал, отриманий від *Rosa* sp. отримано від *Rosa canina*.

У одному з варіантів рослинний матеріал від *Rosa* sp. одержано з плодів.

У одному з варіантів рослинний матеріал від *Urtica dioica* та/або *Tanacetum vulgare* одержано з листків і/або стеблинок.

У одному з варіантів сушіння в операції (б) виконують при температурі в межах від 20 до 50°C, переважно від 37 до 45°C, більш переважно близько 42°C.

У одному з варіантів сушіння рослинного матеріалу в операції (б) здійснюють близько 3-4 дні.

У одному з варіантів органічним розчинником є етанол у кількості переважно 60-96% (об'ємних), переважно 80-96%, більш переважно 96%.

У одному з варіантів інкубацію в операції (г) здійснюють протягом приблизно від 20 до 40 днів,

переважно від 22 до 38 днів, більш переважно від 25 до 35 днів.

У одному з варіантів інкубацію в операції (г) здійснюють при температурі в межах від 20 до 50°C, переважно від 37 до 45°C, більш переважно близько 42°C.

У одному з варіантів спосіб додатково має наступну операцію:

д) додають селен та/або його органічну чи неорганічну сіль;

У одному з варіантів селен додають до отримання концентрації вільного селену від 1 до 100мг/л, переважно від 5 до 50мг/л, більш переважно від 10 до 20мг/л.

У одному з варіантів спосіб додатково має таку операцію:

е) до рослинного екстракту додають сечовину.

У одному з варіантів спосіб додатково має таку операцію:

є) піддають рослинний екстракт дії імпульсно-го електромагнітного поля.

У одному з варіантів імпульс електромагнітного поля має синусоїдальну, прямокутну або стохастичну форму.

У одному з варіантів імпульсне електромагнітне поле має частоту в межах від 5 до 750кГц, переважно від 50 до 350МГц, більш переважно близько 250МГц.

У одному з варіантів імпульсне електромагнітне поле має потужність в межах від 10 до 200Вт, переважно від 20 до 100Вт, більш переважно близько 40Вт.

У одному з варіантів імпульсне електромагнітне поле має силу в межах від 100 до 150мкТ.

У одному з варіантів рослинний екстракт піддають дії імпульсного електромагнітного поля протягом приблизно від 2 до 5 хвилин.

У одному з варіантів рослинний екстракт піддають дії імпульсного електромагнітного поля повторно, переважно тричі.

Мети цього винаходу досягнуто шляхом застосування рослинного екстракту, виготовленого способом згідно з винаходом.

Мети цього винаходу досягнуто шляхом застосування рослинного екстракту згідно з винаходом, виготовленого способом згідно з винаходом, для стимуляції імунної системи пацієнта.

Мети цього винаходу досягнуто шляхом застосування рослинного екстракту згідно з винаходом, виготовленого способом згідно з винаходом, для лікування захворювань, пов'язаних з ослабленням імунної системи пацієнта.

Мети цього винаходу досягнуто шляхом застосування рослинного екстракту згідно з винаходом, виготовленого способом згідно з винаходом, для виробництва фармацевтичного препарату для лікування захворювань, пов'язаних з ослабленням імунної системи пацієнта.

У одному з варіантів захворюванням є ВІЛ-інфекція та/або СНІД.

У одному з варіантів застосування, пацієнт є хребетним, переважно ссавцем, більш переважно людиною.

У одному з варіантів пацієнт не є вагітною.

Мети цього винаходу досягнуто шляхом засто-

сування рослинного екстракту згідно з винаходом, виготовленого способом згідно з винаходом, для лікування вірусних захворювань у пацієнта.

Мети цього винаходу досягнуто шляхом застосування рослинного екстракту згідно з винаходом, виготовленого способом згідно з винаходом, для виробництва фармацевтичного препарату для лікування вірусних захворювань у пацієнта.

У одному з варіантів захворюванням є вірусна інфекція РНК, переважно ретровірусна інфекція, більш переважно ВІЛ-інфекція.

У одному з варіантів застосування, пацієнт є хребетним, переважно ссавцем, більш переважно людиною.

У одному з варіантів пацієнт не є вагітною.

Мети цього винаходу досягнуто шляхом застосування фармацевтичного препарату, що включає рослинний екстракт згідно з винаходом, виготовлений способом згідно з винаходом.

У одному з варіантів фармацевтичний препарат додатково включає фармацевтично прийнятний носій.

У одному з варіантів фармацевтичний препарат призначено для перорального приймання.

Мети цього винаходу досягнуто шляхом застосування набору, що включає фармакологічний препарат згідно з винаходом.

Термін "стохастична форма" означає, що імпульс електромагнітного поля має вид шуму. Імпульс електромагнітного поля має переважно прямокутну форму із синусоїдальною хвилею всередині. "Потужність" (Вт) імпульсного електромагнітного поля, наприклад, означає ефективну потужність. Значення "напруженість магнітного поля" (Т) імпульсного електромагнітного поля вимірюють за подвоєною амплітудою.

Ефект "стимуляції імунної системи" і стану "ослаблення імунної системи" можна визначити, користуючись методами і параметрами, добре відомими в цій галузі. Таке визначення може стосуватись будь-якого компонента клітинної і гуморальної імунної системи, наприклад, Т-лімфоцитів (CD4 та/або CD8 Т-лімфоцитів), В-лімфоцитів, антитіл і компонентів комплементної системи.

Прикладом методу визначення є сортування флуоресцентно-активованих клітин (FACS). CD4 Т-лімфоцити визначають переважно кількісно або у відсотках, більш переважно залежно від часу.

Термін "СНІД" означає тут клінічний стан, що має характеристичні симптоми, пов'язані з пізніми стадіями ВІЛ-інфекції.

Термін "вірусна інфекція РНК" означає тут інфекцію РНКовим вірусом, переважно ретровірусом. Прикладами РНКових вірусів, що мають відношення до винаходу, суть вірус поліомієліту, коксакі-вірус, каліцивірус, віруси гепатиту А, гепатиту С, гепатиту D, гепатиту Е, ентеровірус, ріновірус, вірус краснухи, вірус центрально-європейського енцефаліту, вірус грипу, респіраторно-синцитіальні віруси, вірус парогрипу, вірус кору, вірус епідемічного паротиту, коронавіруси, аренавіруси, Ласса вірус, Бунья вірус, ханта віруси, рабдовіруси, філовіруси, Борна хвороби вірус, вірус Т-клітинної лейкемії людини і ротавіруси.

Термін "фармацевтичний препарат" означає

тут рослинний екстракт згідно з винаходом. Це також фармацевтичний препарат, що включає принаймні один фармацевтично активний компонент рослинного екстракту згідно з винаходом і/або принаймні одне похідне або аналог вказаного активного компонента і відповідних його солей.

Фармацевтичний препарат може мати форму рідини, наприклад, розчину, сиропу, еліксиру, емульсії або суспензії, або тверду форму, наприклад, капсули, капсульної таблетки, таблетки, пігулки, порошку та супозиторія. Придатні для застосування також гранули, напіврізкі форми і капсули, вкриті желатиною. Якщо фармацевтичний препарат є рідиною або порошком, дозу можна визначити, наприклад, чайною ложкою. На додаток до рослинного екстракту або фармацевтично активного компонента фармацевтичний препарат може мати в своєму складі такі компоненти, як ароматизатори, підсолоджувачі, барвники, консерванти, стабілізатори, розріджувачі, суспензуючі речовини, гранулюючі речовини, змащувачі, зв'язувальні речовини та дезінтегратори. Наприклад, таблетка може бути покрита оболонкою. Рідина для ін'єкцій повинна бути стерильною. Також передбачається трансдермальна система доставки і ліпосомна система. Всі згадані форми можуть бути негайно-го, відстроченого і сповільненого вивільнення.

Термін "фармацевтично прийнятний", як він використовується в цьому документі, означає, принаймні, не токсичний. "Фармацевтично прийнятне несуче середовище", згадане в цьому документі, може бути представлено великою різноманітністю форм залежно від бажаного способу введення. Термін включає загальноживані фармакологічні розчинники, такі як вода або етанол, і загальноживані компоненти таблетованих форм, такі як кукурудзяний крохмаль, лактоза, сахароза, сорбітол, тальк, стеаринова кислота, стеарат магнію, дикальційфосфат або декстрин.

Введення фармакологічного препарату, відповідного даному винаходу, може бути здійснено різними шляхами, такими як пероральний, сублінгвальний, парентеральний, внутрішньовенний, внутрішньоперитонеальний, назальний, вагінальний, ректальний, підшкірний, внутрішньошкірний, внутрішньом'язовий і ін. Кожна доза може бути введена за один або кілька разів за день, тиждень або місяць. Введення також може бути постійним краплинним або, наприклад, через систему повільного трансдермального введення.

Таким чином, справжній винахід є комбінованим рослинним екстрактом *Rosa sp.*, *Urtica dioica* та/або *Tanacetum vulgare*, підданий дії електромагнітного поля. Клінічні дані показали позитивний лікувальний ефект екстракту в лікуванні СНІДу. Дослідження, проведені *in vitro* і в експериментальній моделі на лабораторних тваринах виявили відсутність у екстракту токсичності, мутагенності або онкогенності. Проте він протипоказаний при вагітності.

Винахід буде описано в докладніших деталях з приводом прикладів, як це показано нижче. Даними прикладами, проте, не обмежуються права на власність винаходу і межі захисту цих прав.

Приклад 1: Приготування свіжих рослинних

екстрактів

Листя і тонкі стебла кропиви (*Urtica dioica*) і пижма (*Tanacetum vulgare*) збираються в дикорослому вигляді. Після відбору придатного до використання матеріалу і первинної промивки матеріал висушується на дерев'яній сітці в темному місці протягом 3-4 днів, переважно при 42°C. У висушеному стані рослинний матеріал повинен мати зелене забарвлення без якої-небудь зміни кольору, листя і стебла повинні легко кришитися. Для виготовлення екстракту використовуються герметичні скляні судини. Висушений рослинний матеріал подрібнюється на дрібні частини (2-5см) і поміщається в скляну судину так, щоб заповнити його без залишку. Після ущільнення (трамбування) матеріалу він заливається етанолом (96%; у даному документі відсоток розчину етанолу має на увазі його відсоток в об'ємному відношенні) так, щоб в судині не залишилося вільного місця. Судини поміщаються в інкубатор (37-45°C, переважно 42°C) на 20-40 днів до тих пір, поки не вийде розчин темно-зеленого кольору.

Для отримання екстракту дикої троянди (*Rosa canina*) використовуються її висушені плоди. У іншому варіанті замість дикої троянди або на додаток до неї можуть використовуватися інші види роду *Rosa*. Плоди поміщаються в герметичні судини так, щоб заповнити їх до половини, і додається етанол. Судини поміщаються в інкубатор (37-45°C, переважно 42°C) на 20-40 днів до тих пір, поки не вийде розчин червоно-оранжевого кольору.

Після витримки в інкубаторі, коли рослинний матеріал повністю втрачає забарвлення, екстракт відділяється від рослинного матеріалу шляхом пропускання через матерчатий фільтр.

Приклад 2: Обробка електромагнітним полем

Екстракт *Rosa canina* поміщають в електромагнітне поле на 3хв. Потім по 50-70мл опроміненого екстракту *Rosa canina* додають окремо до 2 л екстракту *Urtica dioica* і екстракту *Tanacetum vulgare*. До кожного літра комбінованого екстракту *Urtica/Rosa* і *Tanacetum/Rosa* додають по 16 міліграм селену і по 150 міліграм сечовини. У іншому варіанті додають або тільки селен, або тільки сечовину. Потім судини запечатують знову і поміщають в інкубатор при 42°C на 24 години. Після інкубації судини поміщають чотирикратно в електромагнітне поле, кожного разу по три хвилини, і після цього їх зміст з'єднують. Екстракт, що вийшов в результаті, пропускають послідовно через фільтр в 5мкм, 0,45мкм і 0,22мкм, і розливають в стерильні флакони. Після маркування і пакування рослинний екстракт готовий до застосування.

Електромагнітне поле, в яке поміщають екстракт, є імпульсним, потужним і монополярним, при якому напрям електричного струму, що згенерував генератором магнітних імпульсів, залишається незмінним. Імпульсне магнітне поле має дуже широкий діапазон частот, від 5кГц до 750кГц. У даному прикладі використовують імпульс прямокутної форми. Проте, в інших варіантах можливо використовувати імпульс синусоїдальної або випадкової форми. Переважно використання імпульсу прямокутної форми з вписаною в нього синусоїдальною хвилею. Не дивлячись на те, що це не пов'язано ні

з якою теорією, є гіпотеза, що особливий вид імпульсів, що генеруються, викликає деякі зміни у фізичній конфігурації атомів в молекулах та/або в розташуванні молекул в просторі, що веде до зміни їх хімічних властивостей.

В процесі приготування рослинного екстракту використовується 3-4-кратне опромінювання електромагнітними імпульсами високої частоти по 2-5хв. Електрична потужність (ефективна потужність) імпульсів близько 20-100Вт, якнайкращий ефект досягається при значенні в 45Вт.

#### Приклад 3: Доклінічне дослідження

У доклінічному дослідженні рослинний екстракт, відповідний даному винаходу, випробовувався на наявність гострої і хронічної токсичності. При дослідженні на гостру токсичність препарату мишам лінії Balb/c і щурам лінії Вістара виконувалися одиничні внутрішньом'язові (в/м) ін'єкції. Хронічну токсичність препарату досліджували протягом 3 місяців на щурах лінії Вістара і протягом 1 місяця на собаках. Було досліджено можливий мутагенний, ембріотоксичний, тератогенний, алергенний, імунотоксичний ефекти рослинного екстракту, а також його дія на репродуктивну систему.

В результаті проведених експериментів було доведено, що рослинний екстракт, відповідний справжньому винаходу, є малотоксичним препаратом при разовому введенні в/м мишам Balb/c і щурам Вістара. В умовах експерименту на гостру токсичність інтраперитонеальне введення екстракту, розведеного у фізіологічному розчині 1:5, виявило значення ЛД<sub>50</sub> 51-54мл/кг для щурів і 56/59мл/кг для мишей.

При введенні мишам BALB/c і щурам Вістара рослинного екстракту в/м або в/п не спостерігалось ніяких специфічних або статевих відмінностей в чутливості лабораторних тварин до токсичного ефекту екстракту. Характер інтоксикації мишей BALB/c і щурів Вістара в дозах ЛД<sub>50</sub> був схожий з отруєнням етиловим спиртом; при приготуванні рослинного екстракту етанол у високій концентрації застосовували як розчинник. При дослідженні хронічної токсичності рослинного екстракту після в/м введення щурів в дозах 0,07 і 0,21мл/кг раз на добу протягом 3 місяців (в 10 і 30 разів вище за дозову дозу для людини) і собакам в дозі 0,07мг/кг (в 10 разів вище за дозову дозу для людини) раз на добу протягом 1 місяця не спостерігалось будь-якого пошкодження головних органів і організму тварин.

Рослинний екстракт, відповідний справжньому винаходу, не володіє мутагенністю і не впливає на

репродуктивну функцію тварин. При введенні щурам рослинного екстракту в/м один раз в добу протягом вагітності (з першого дня до родів) в дозі 0,21мл/кг препарат виявив ембріотоксичні та тератогенні властивості. У зв'язку з цим він протипоказаний при вагітності.

Крім того, при використанні в дозах 0,07 і 0,14мл/кг, що вводили морським свинкам щодня протягом 10 діб, рослинний екстракт не виявив алергічних або імунотоксичних властивостей.

Як висновок необхідно відзначити, що результати токсикологічних досліджень показали, що рослинний екстракт згідно з винаходом, може бути використаний в систематичних клінічних випробуваннях з урахуванням його протипоказання при вагітності.

#### 3.1. Гостра токсичність

Дослідження проводили на 128 мишах BALB/c (чоловічої і жіночої статі, маса тіла 18-20г) і на 47 пацюках Вістара (чоловічої і жіночої статі, маса тіла 180-220г) при в/м введенні рослинного екстракту мишам і в/п введенні мишам і пацюкам. Рослинний екстракт розводили в стерильному фізіологічному розчині 1:10 і 1:5, піддослідним тваринам вводили різні кількості отриманого розчину. Для того, щоб визначити токсичний ефект препарату, лабораторних тварин спостерігали протягом 14 днів.

Токсичність рослинного екстракту після одноразового введення лабораторним тваринам визначали двоступінчастим методом: спочатку приблизне значення ЛД<sub>50</sub> встановлювали методом Даймана і Лебланка, потім встановлювали точні значення ЛД<sub>16</sub>, ЛД<sub>50</sub>±д.в. і ЛД<sub>84</sub> пробіт-аналізом по Літчфілду і Вілкоксону.

Проведені експерименти виявили, що одноразова в/м ін'єкція рослинного екстракту, розведеного 1:10 у фізіологічному розчині в дозах 25-50мл/кг мишам BALB/c не викликає інтоксикації і смерті тварин. Коли дози збільшують до 75-100мл/кг, спостерігається пониження рухової активності, але без смерті тварини. Ін'єкції рослинного екстракту, розведеного 1:5 у фізіологічному розчині в дозах 25-50мл/кг, викликали біль, виражений пригнічуваний стан і через декілька годин смерть тварин. Характер інтоксикації рослинним екстрактом у мишей був схожий з отруєнням етиловим спиртом (37,3мл/кг), який присутній в рослинному екстракті у високій концентрації як носій. Результати, одержані на пацюках Вістара, були схожі з тими, що спостерігалися у мишей BALB/c.

Таблиця 1

Параметри гострої токсичності рослинного екстракту і етанолу (96%), розведених у відношенні 1:5 у фізіологічному розчині в різних концентраціях після введення лабораторним тваринам в/м і в/о

Спосіб застосування	Показники токсичності [мл/кг]					
	ЛД <sub>16</sub>	ЛД <sub>50</sub> ±д.в.	ЛД <sub>84</sub>	ЛД <sub>16</sub>	ЛД <sub>50</sub> ±д.в.	ЛД <sub>84</sub>
	Чоловіча стать			Жіноча стать		
	миші BALB/c,рослинний екстракт					
внутрішньом'язовий	53	66±4,6	82	49	62±4,3	78
внутрішньоочеревинний	46	59±3,8	75	43	56±3,7	72

Продовження таблиці 1

миші BALB/c, етиловий спирт						
внутрішньоочеревинний	30,4	37,3±2,1	44,8	н.в.*	н.в.	н.в.
Вістара пацюки, рослинний екстракт						
внутрішньоочеревинний	42	54±4,3	71	8	51±4,2	67

\* н.в. - не визначено

Дані, представлені вище в таблиці 1, показують, що токсичність рослинного екстракту відносно до параметрів токсикометрії не має істотних відмінностей для в/м і в/о ін'єкцій.

### 3.2. Хронічна токсичність

#### 3.2.1. Дослідження на щурах

Дослідження токсичності рослинного екстракту згідно з винаходом проводили протягом 3 місяці шляхом в/м введення препарату пацюкам Вістара. Дані досліди були проведені на 90 пацюках Вістара (чоловічої і жіночої статі, маса тіла 180-220г), розділеним на 3 групи по 30 тварин в кожній (15 особин чоловічої статі і 15 жіночої). Перша група була контрольною (фізіологічний розчин), друга група одержувала рослинний екстракт в дозі

0,07мл/кг, і третя група одержувала рослинний екстракт в дозі 0,21мл/кг. Досліджувані дози рослинного екстракту були в 10 і в 30 разів вищими за добову терапевтичну дозу, рекомендовану для людини (0,5мл рослинного екстракту, розведеного в 5мл фізіологічного розчину або 0,007мл/кг).

Результати показали, що в/м ін'єкції рослинного екстракту в дозах 0,07 і 0,21мл/кг не впливають на загальний стан і поведінку пацюків. Під час експерименту на хронічну токсичність не спостерігалося статистично значущої різниці в рівнях еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів і гемоглобіну між тваринами, що одержали 0,07 і 0,21мл/кг рослинного екстракту, і тваринами в контрольній групі (таблиці 2 і 3).

Таблиця 2

Гематологічні показники у щурів  
чоловічої статі після 3 місяців в/м введення рослинного екстракту

Еритроцити $\times 10^{12}/л$			
Період спостереження	Контроль	Рослинний екстракт	
		0,07мл/кг	0,21мл/кг
Початкове значення	7,3±0,6	7,4±0,4	7,3±0,2
Через 1 місяць	7,3±0,5	7,5±0,4	7,7±0,5
Через 3 місяці	7,6±0,4	7,8±0,3	7,7±0,6
Лейкоцити $\times 10^9/л$			
Період спостереження	Контроль	Рослинний екстракт	
		0,07мл/кг	0,21мл/кг
Початкове значення	11,4±0,7	11,0±0,5	11,0±0,5
Через 1 місяць	11,7±0,6	11,1±0,3	11,2±0,4
Через 3 місяці	11,2±0,7	11,2±0,4	11,3±0,6
Тромбоцити $\times 10^9/л$			
Період спостереження	Контроль	Рослинний екстракт	
		0,07мл/кг	0,21мл/кг
Початкове значення	660±30	660±30	660±30
Через 1 місяць	672±33	663±23	669±24
Через 3 місяці	667±29	669±31	655±28
Гемоглобін г/л			
Період спостереження	Контроль	Рослинний екстракт	
		0,07мл/кг	0,21мл/кг
Початкове значення	111±4	110±3	111±2
Через 1 місяць	114±3	115±4	117±5
Через 3 місяці	116±4	115±3	118±3

Таблиця 3

Гематологічні показники у пацюків  
жіночої статі після 3 місяців в/м введення рослинного екстракту

Еритроцити $\times 10^{12}/л$			
Період спостереження	Контроль	Рослинний екстракт	
		0,07мл/кг	0,21мл/кг
Початкове значення	7,2±0,4	7,2±0,3	7,0±0,3
Через 1 місяць	7,1±0,4	7,4±0,5	7,6±0,4
Через 3 місяці	7,3±0,4	7,7±0,4	7,8±0,3

Продовження таблиці 3

Лейкоцити $\times 10^9/\text{л}$			
Період спостереження	Контроль	Рослинний екстракт	
		0,07мл/кг	0,21мл/кг
Початкове значення	11,3 $\pm$ 0,4	11,6 $\pm$ 0,5	11,4 $\pm$ 0,3
Через 1 місяць	11,5 $\pm$ 0,5	11,2 $\pm$ 0,3	11,5 $\pm$ 0,5
Через 3 місяці	11,2 $\pm$ 0,6	11,1 $\pm$ 0,4	11,2 $\pm$ 0,3
Тромбоцити $\times 10^9/\text{л}$			
Період спостереження	Контроль	Рослинний екстракт	
		0,07мл/кг	0,21мл/кг
Початкове значення	670 $\pm$ 27	660 $\pm$ 20	671 $\pm$ 25
Через 1 місяць	678 $\pm$ 24	669 $\pm$ 27	673 $\pm$ 22
Через 3 місяці	667 $\pm$ 25	668 $\pm$ 21	662 $\pm$ 22
Гемоглобін г/л			
Період спостереження	Контроль	Рослинний екстракт	
		0,07мл/кг	0,21мл/кг
Початкове значення	112 $\pm$ 4	110 $\pm$ 3	111 $\pm$ 4
Через 1 місяць	114 $\pm$ 3	118 $\pm$ 4	119 $\pm$ 4
Через 3 місяці	113 $\pm$ 5	119 $\pm$ 6	119 $\pm$ 7

В рамках експерименту за визначенням хронічної токсичності в/м ін'єкції препарату щурам в дозах 0,07мл/кг і 0,21мл/кг не виявили значних змін загального білка сироватки крові. Відсутність ушкоджувальної дії рослинного екстракту при тривалому (3 місяці) введенні його щурам в дозах 0,07 і 0,21мл/кг обумовлено також стабільною активністю печінкових ферментів, таких як аспартат і аланінамінотрансфераза, лактат-дегідрогеназа і лужна фосфатаза. Тривале введення рослинного екстракту пацюкам не вплинуло на рівень білірубину, холестерину, тригліцеридів, сечовини, креатиніну і глюкози сироватки крові у експериментальних тварин.

Тривале введення в стегновий м'яз тварин препарату в дозах 0,07 і 0,21мл/кг, розведеного 1:10 у фізіологічному розчині, не виявило місцевої дратівливої дії.

Макроскопічне дослідження не виявило яких-небудь токсичних або токсико-алергічних реакцій на рослинний екстракт у цієї групи тварин.

Не було виявлено жодних змін внутрішніх органів (мозку, шишковидної залози, тимуса, трахей, легенів, серця, стравоходу, селезінки, печінки,

підшлункової залози, надниркової залози, нирок, шлунку у обох статей) у цієї групи тварин протягом 3 місяців після в/м ін'єкцій рослинного екстракту в дозі 0,21мл/кг.

### 3.2.2. Дослідження на собаках

Дослідження було проведено на 8 собаках (чоловічої статі, початкова маса тіла 12-14.5кг), які були розділені на 2 групи по 4 тварин в кожній: перша група - контроль, друга група - рослинний екстракт 0,07мл/кг. Дози препарату, що вводяться, були в 10 разів вищі за найвищі терапевтичні дози для людини. Досліджуваний препарат в дозі 0,07мл/кг був розведений в стерильному фізіологічному розчині відносно 1:10 і потім вводився в стегновий м'яз собак раз на добу протягом місяця.

Електрокардіографічне дослідження (ЕКГ), виконане на собаках перед початком експерименту і через 1 місяць після початку введення дози 0,07мл/кг, не виявило збільшення частоти серцевих скорочень або інших змін показників ЕКГ. Всі показники ЕКГ не відрізнялися перед і після експерименту у тварин, яких піддали терапії, від тварин в контрольній групі (таблиця 4).

Таблиця 4

Показники ЕКГ у собак, що одержували рослинний екстракт у в/м ін'єкціях в дозі 0,07мл/кг протягом 1 місяця

Показники ЕКГ	Початкове значення		Через 1 місяць	
	Контроль	Рослинний екстракт 0,07мл/кг	Контроль	Рослинний екстракт 0,07мл/кг
R-R, мс	467 $\pm$ 38	458 $\pm$ 35	466 $\pm$ 32	462 $\pm$ 22
P-Q, мс	86 $\pm$ 12	89 $\pm$ 16	85 $\pm$ 21	89 $\pm$ 16
Q-T, мс	139 $\pm$ 19	146 $\pm$ 18	138 $\pm$ 15	139 $\pm$ 15
QRS, мс	40 $\pm$ 6	39 $\pm$ 3	39 $\pm$ 4	39 $\pm$ 6
ST, мс	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2
TP, мс	189 $\pm$ 19	1392 $\pm$ 28	186 $\pm$ 22	194 $\pm$ 23
P, мс	0,30 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,05	0,26 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,04
R, мс	1,38 $\pm$ 0,12	1,39 $\pm$ 0,24	1,42 $\pm$ 0,22	1,38 $\pm$ 0,23
T, мс	0,30 $\pm$ 0,06	0,32 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,05
Частота серцевих скорочень, хв.	139 $\pm$ 15	145 $\pm$ 15	138 $\pm$ 12	146 $\pm$ 12

Результати показали, що в/м введення рослинного екстракту собакам раз на день протягом 1

місяця в дозі 0,07мл/кг (в 10 разів вище за добову дозу для людини) не робить впливу на загальний

стан і поведінку тварин, а також що дана терапія не змінює функціональний статус головних органів і систем організму тварин.

Відповідно до даних гістологічного дослідження, у собак не було виявлено ніяких токсичних або місцевих дратівливих реакцій протягом 1 місяця після в/м ін'єкцій рослинного екстракту в дозі 0,07мл/кг.

### 3.3. Мутагенність.

3.3.1. Генні мутації у мікроорганізмів (Еймса проба)

Мутагенну активність рослинного екстракту було оцінено методом визначення здатності речовини викликати мутації генів у мікроорганізмах-індикаторах в системі метаболічної активації *in vitro* і поза такою системою. Для ідентифікації му-

тацій було застосовано метод засівання культури на чашках. Цей метод був запропонований Еймсом із співавторами, і як мікроорганізмами-індикаторами ми скористались трьома автотрофними штамми на гістидині, а саме *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 і TA 1537.

Для проведення проби Еймса був одержаний наступний розчин рослинного екстракту: був відміряний і зважений початковий розчин препарату, після чого розбавлений дистильованою водою до концентрації 10мг/мл. Потім було виконане подальше розведення в дистильованій воді, і розчин поміщений в чашки Петрі. Досліджувався препарат в концентрації від 0,1 до 1000мг на чашку. Як негативний контроль використовували дистильовану воду.

Таблиця 5

Вплив рослинного екстракту  
на бактеріальний штам-індикатор TA 98 в пробі Еймса

Досліджувана речовина	Доза мкг/чашка	штам TA 98							
		-S9				+S9			
		M <sub>1,2,3</sub>	Середнє	M <sub>0</sub> /M <sub>K</sub>	MA	M <sub>1,2,3</sub>	Середнє	M <sub>0</sub> /M <sub>K</sub>	MA
Негативний контроль (H <sub>2</sub> O)	0	33 29 37	32,8	1	-	40 36 31	35,5	1	-
Позитивний контроль (2AA)	20	0 0 0	0 0 0	0 0 0	-	1211 1280 1140	1209	34,0	+
Позитивний контроль (ANQO)	0,5	568 567 614	6	17,8	+	0 0 0	0 0 0	0 0 0	-
Рослинний екстракт	0,1	35 32 35	34,0	1,04	-	30 42 45	38,4	1,08	-
	1,0	29 32 37	32,5	0,99	-	40 35 29	34,4	0,97	-
	10,0	28 34 38	33,1	1,01	-	36 35 32	34,3	0,97	-
	100,0	27 30 26	27,6	0,84	-	19 27 31	25,1	0,71	-
	1000,0	29 28 33	29,9	0,91	-	30 28 39	32	0,90	-

Умовні позначення і скорочення:

M<sub>i</sub> - число ревертантів в чашці,

M - середнє геометричне число,

M<sub>0</sub>/M<sub>K</sub> - відношення кількості ревертантів в дослідженні та кількості ревертантів в негативному контролі,

MA - мутагенна активність: "+" – наявність активності, "-" – відсутність активності.

Таблиця 6

Вплив рослинного екстракту  
на бактеріальний штам-індикатор TA 100 в пробі Еймса

Досліджувана речовина	Доза мкг/чашка	штам TA 100							
		-S9				+S9			
		M <sub>1,2,3</sub>	Середнє	M <sub>0</sub> /M <sub>K</sub>	MA	M <sub>1,2,3</sub>	Середнє	M <sub>0</sub> /M <sub>K</sub>	MA
Негативний контроль (H <sub>2</sub> O)	0	144 223 228	194,2	1	-	188 287 206	223,2	1	-
Позитивний контроль (2AA)	20	0 0 0	0 0 0	0 0 0	-	2712 2008 2200	2288,2	10,2	+
Позитивний контроль (натрій азид)	2,0	1240 1368 1288	1297,6	6,68	+	0 0 0	0 0 0	0 0 0	-
Рослинний екстракт	0,1	185 154 225	185,8	0,96	-	190 253 284	239,0	1,07	-
	1,0	154 169 213	177	0,91	-	176 185 222	193,3	0,87	-
	10,0	153 201 242	195,2	1,00	-	175 185 193	184,2	0,82	-
	100,0	165 221 213	198,0	1,02	-	146 202 201	181,0	0,81	-
	1000,0	209 207 202	206	1,06	-	131 136 194	151,2	0,68	-

Таблиця 7

Вплив рослинного екстракту  
на бактеріальний штам-індикатор TA 1537 в пробі Еймса

Досліджувана речовина	Доза мкг/чашка	штам TA 1537							
		-S9				+S9			
		M <sub>1,2,3</sub>	Середнє	M <sub>0</sub> /M <sub>K</sub>	MA	M <sub>1,2,3</sub>	Середнє	M <sub>0</sub> /M <sub>K</sub>	MA
Негативний контроль (H <sub>2</sub> O)	0	6 6 10	7,11	1	-	9 9 11	9,62	1	-
Позитивний контроль (2AA)	20	0 0 0	0 0 0	0 0 0	-	126 144 118	128,9	13,4	+
Позитивний контроль (9AA)	20	5448 5632 5752	5609,3	788,5	+	0 0 0	0 0 0	0 0 0	-



Продовження таблиці 7

Рослинний екстракт	0,1	6 6 4	5,24	0,74	-	7 6 8	6,95	0,72	-
	1,0	8 7 7	7,32	1,03	-	10 8 8	8,62	0,90	-
	10,0	10 10 9	9,65	1,36	-	5 3 3	3,56	0,37	-
	100,0	5 5 5	5,00	0,70	-	8 7 9	7,96	0,83	-
	1000,0	10 8 9	8,96	1,26	-	7 6 5	5,94	0,62	-

З наведених вище даних ми можемо зробити висновок, що рослинний екстракт в концентрації 0,1-1000 мкг на чашку не викликає збільшення числа ревертантів у *Salmonella typhimurium* штамів ТА 98, ТА 100, ТА 1537. Таким чином, відповідно до проби Еймса, рослинний екстракт не має мутагенного ефекту.

3.3.2. Домінантні летальні мутації в зародкових клітинах мишей

З метою оцінки можливих мутагенних властивостей рослинного екстракту були проведені експерименти по дослідженню домінантних летальних мутацій у мишей гібридів F1 (CBAxC<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>).

Рослинний екстракт, розведений у фізіологічному розчині, було уведено в/м мишам чоловічої статі в дозі 0,7мл/кг. Доза в 100 разів перевищувала рекомендовану добову дозу для людини (0,007мл/кг).

Таблиця 8

Результати здатності рослинного екстракту викликати домінантні летальні мутації в клітинах зародків мишей

Стадії сперматогенезу	Доза	Загальна кількість особин жіночої статі	Кількість вагітних особин жіночої статі	Фертильність (%)	Втрати після імплантації	X <sup>2</sup>
Нормальні сперматозоїди	0 (контроль)	41	33	80,5	0,112	
	Рослинний екстракт 700мкл/кг	39	34	75,6	0,011	
Пізнні сперматиди	0 (контроль)	42	30	71,4	0,082	
	Рослинний екстракт 700мкл/кг	39	29	74,4	0,037	
Ранні сперматиди	0 (контроль)	42	38	90,5	0,055	9,87
	Рослинний екстракт 700мкл/кг	38	29	76,3	0,143	
Повторні експерименти	Рослинний екстракт 700мкл/кг	32	24	75,0	0,061	0,018
Середнє 2-х експериментів	Рослинний екстракт 700мкл/кг	35	27	90,5	0,099	2,93
Сума експериментів і повторних експериментів	Рослинний екстракт 700мкл/кг	70	53	76,0	0,097	
Результати 4-го тижня	Рослинний екстракт 700мкл/кг	33	33	100	0,040	

Як видно з таблиці 8, частота відторгнення зародка після імплантації у тварин, яким вводили один раз в/м рослинний екстракт в дозі 700мкл/кг, не перевищує частоти такого відторгнення у тварин в контрольній групі.

3.3.3. Хромосомна аберація в клітинах кісткового мозку мишей

Суть цього методу полягає в оцінці впливу ре-

човини, що вивчається, введеної в організм тварини, на генетичну систему клітин кісткового мозку, чутливих до впливу хімічних речовин і фізичних чинників. Хромосомні аберації аналізували після введення рослинного екстракту по схемі, описаній в "Інструкції для експериментальних (доклінічних) досліджень нових фармакологічних препаратів".

Таблиця 9

Структурні пошкодження хромосом в клітинах кісткового мозку мишей під дією рослинного екстракту

Варіанти	№	Кількість клітин		Аберації				
		Підраховано	З абераціями	Фрагменти		Обмін	Кількість	Інтервали
				Одиночні	Парні			
Рослинний екстракт, 700мкл/кг (підраховано після 24 годин)	1	100	0	0	0	0	0	0
	2	100	1	0	0	0	0	1
	3	100	2	2	0	0	0	0
	4	100	2	2	0	0	0	0
	5	100	0	0	0	0	0	0
Загалом		500	5	4	0	0	0	1
Рослинний екстракт, 700мкл/кг ін'єкції 4 дні (підраховано через 6 годин після 4го дня)	1	100	0	0	0	0	0	0
	2	100	1	0	0	0	0	1
	3	100	2	2	0	0	0	0
	4	100	1	1	0	0	0	0
	5	100	0	0	0	0	0	0
Загалом		500	4	3	0	0	0	1

Продовження таблиці 9

Нормальний фізіологічний розчин	1	100	2	2	0	0	0	0
	2	100	1	0	0	0	0	1
	3	100	2	1	0	0	0	1
	4	100	0	0	0	0	0	0
	5	100	0	0	0	0	0	0
Загалом		500	5	3	0	0	0	2

Як видно з даних експерименту, статистично значуща різниця в рівні хромосомних аберацій в кістковому мозку мишей, яких піддали дії рослинного екстракту в тестових дозах, в порівнянні з контрольною групою не спостерігалася. Тому, відповідно до результату тесту на хромосомні аберації в клітинах кісткового мозку, можна зробити висновок, що рослинний екстракт не має мутагенної активності.

3.3.4. Ушкоджувальна дія на ДНК згідно з методом SOS-хромотеста

Одним з тестів на пошкодження ДНК є тест на визначення індукції SOS-відповіді бактерійної стінки під впливом досліджуваної речовини, так званий SOS-хромотест. Тест заснований на знанні SOS-відповіді на пошкодження ДНК. Основою тесту є штам *E. coli* PQ 37, створений за допомогою асоціації гена *LacZ*, відповідального за синтез ферменту бета-галактозидази, з геном *SfiA*, керованим головним репресором SOS-системи. При пошкодженні ДНК індукується експресія *SfiA* як компоненту SOS-відповіді. У даному тесті SOS-відповідь вимірюється з допомогою якісного визначення ферментної активності бета-галактозидази, яка оцінюється з допомогою кольорової реакції. Маркером росту клітин в даному штамі є лужна фосфатаза, активність якої може бути також виміряна з допомогою кольорової реакції. В результаті аналізу було одержано криві за-

лежності синтезу бета-галактозидази від концентрації досліджуваної речовини, а також криві, що характеризують зміни росту бактерій в даних умовах. Відповідно до цих значень було підраховано потенційну можливість індукції SOS-відповіді. Ця потенційна можливість відображає здатність речовини індукувати експресію гена *sfiA*.

Отримані результати показали, що рослинний екстракт не індукував активації системи відновлення ДНК для всіх досліджених концентрацій у *E. coli* PQ 37. Таким чином, рослинний екстракт не має ушкоджувальної дії на ДНК.

#### 3.4. Ембріотоксичність і тератогенність

Експеримент було проведено на 36 вагітних пацюках Вістара, розділених на дві групи по 18 пацюків в кожній: перша група контрольна, друга - рослинний екстракт (у дозі 0,21мл/кг, що в 30 разів перевищує максимальну добову дозу для людини). Препарат був розведений фізіологічним розчином і вводився пацюкам в/м один раз в день протягом всього періоду вагітності (з першого дня до родів). Контрольним тваринам вводили відповідну кількість фізіологічного розчину щодня з першого дня вагітності і до родів. На 20-й день вагітності 70% вагітних пацюків забивали шляхом зсуву шийних хребців в цілях вивчення кісткового скелета і внутрішніх органів плодів і визначення ознак їх загибелі перед і після імплантації.

Таблиця 10

Зміни маси тіла вагітних пацюків (% від початкового)

Групи тварин	1 тиждень	2 тижні	3 тижні
Контроль	123±1,9	136,7±2,2	145,7±2,8
Рослинний екстракт, 0,21мл/кг	112,5±1,5*	120,5±3,4*	131,6±4,5*

Примітка: \* указує на істотну різницю ( $P < 0,05$ )

Як показано в таблиці 10, в/м ін'єкції вагітним самкам рослинного екстракту в дозі 0,21мл/кг не зробили впливу на збільшення маси тіла в порівнянні з контрольною групою вагітних самок впродовж всього періоду вагітності.

Такі критерії оцінки ембріотоксичності рослинного екстракту в період вагітності, як число живих плодів, місця імплантації, жовті тіла і маса ембріональних тіл, були нижчі в групі щурів, що одержу-

вали препарат. Індекс доїмплантаційної загибелі в експериментальній групі був значно вищий, ніж в контрольній, але рівень загибелі після імплантації виявився нижчим. Черепно-каудальний розмір плодів вагітних щурів, що одержували препарат в дозі 0,21мл/кг статистично не відрізнявся від відповідного розміру плодів щурів в контрольній групі (таблиця 11).

Таблиця 11

Показники ембріотоксичного ефекту рослинного екстракту  
в дозі 0,21мл/кг при в/м введенні препарату з першого по 20-й день вагітності

Досліджені показники	Контроль	Рослинний екстракт 0,21мл/кг
Тривалість вагітності (дні)	24,5±0,2	23,3±0,2*
Кількість ембріонів у пацюка	9,5±1,3	5,5±0,6*
Кількість жовтого тіла у пацюка	10,0±1,2	6,0±0,8*
Смертність до імплантації (%)	13,5	40,8
Смертність після імплантації (%)	8	5,1
Черепно-каудальний розмір плоду (см)	3,3±0,1	3,0±0,1
Вага плоду (г)	3,0±0,1	2,2±0,2*

Примітка: \* указує на істотну різницю ( $P < 0,05$ )

Макроскопічне і мікроанатомічне дослідження (стандартні зрізи по Вілсону-Дібану) зародків, що піддалися дії рослинного екстракту в пренатальному періоді в дозі 0,21мл/кг, виявило недорозвинення плоду в 6,7% випадків. Частота такої патології, як гідронефроз і гемоперикард, в групі пвцюків, що одержували рослинний екстракт в період вагітності, перевищувала таку в контрольній групі.

При аналізі тіла плодів з алізарином з метою вивчення розвитку кісткової системи у зародків пацюків, що піддалися дії рослинного екстракту в дозі 0,21мл/кг в пренатальному періоді, не було виявлено ніяких пороків розвитку скелета. Проте в більшості досліджених вогнищ окостеніння була виявлена затримка осифікації.

На закінчення необхідно відзначити, що в/м введення рослинного екстракту в дозі 0,21мл/кг (доза, що в 30 разів перевищує максимальну терапевтичну дозу для людини) вагітним щурам з першого по 20-й день вагітності надало негативну дію на масу тіла вагітних щурів і тривалість вагітності. Спостерігався вплив препарату на показники ембріотоксичності, такі як кількість живих плодів, вага ембріонів, кількість місць імплантації і жовтих тіл, на показники перед- і післяімплантаційної загибелі, а також на затримку осифікації.

Протягом постнатального періоду у молодих щурів було відмічено значне відставання фізичного розвитку. У експериментальній групі недорозвинення плодів було виявлено в 6,7% випадків. Це недорозвинення може розглядатися як порок розвитку ембріонів.

Таким чином, був виявлений ембріотоксичний і тератогенний ефект рослинного екстракту в дозі 0,21мл/кг. Відповідно до цього вагітність повинна розглядатися як протипоказання до введення даного препарату.

### 3.5. Вплив на репродуктивну функцію

Дослідження було виконано на пацюках Вістара (чоловічої і жіночої статі, початкова маса тіла 180-200г). Група жіночих особин, що складалася з 60 тварин, була розділена на дві підгрупи; контрольна група (40 тварин) і експериментальна група (20 тварин). Щодня самкам з експериментальної групи вводили в/м 0,21мл/кг рослинного екстракту протягом 2 тижнів (3-4 естроцикл). Для ін'єкції препарат було розведено фізіологічним розчи-

ном.

Внутрішньом'язові ін'єкції 0,21мл/кг рослинного екстракту щурам обох полови не зрадили такі показники репродуктивної функції щурів як кількість жовтих тіл, імплантацій, живих плодів і резорбції. Кількість випадків перед- і післяімплантаційної загибелі плоду майже не відрізнялася від такого в контрольній групі; це було вірно і для самок, що одержували препарат, і для самок, запліднених самцями, що одержували ін'єкції препарату.

Дослідження допомогло встановити, що в/м ін'єкції 0,21мл/кг рослинного екстракту (що в 30 разів вище за максимальну добову дозу, рекомендовану для людини) не впливають ні на статеву активність, ні на репродуктивні показники (кількість живих плодів, масу їх тіла, число жовтих тіл, черепно-каудальний розмір, місця імплантації, резорбцію), ні на неонатальний розвиток пацюків. Таким чином, якої-небудь дії досліджуваного препарату на репродуктивну функцію сексуально здорових дорослих пацюків виявлено не було.

### 3.6. Дія на імунітет

#### 3.6.1. Алергічні і анафілактичні реакції

Дане дослідження було проведено відповідно до "Методичних вказівок для оцінки алергенних особливостей фармакологічних препаратів" (Керівництво до експериментальних досліджень нових фармакологічних препаратів. Москва, 2000, с.25-32).

Дослідження було проведено на 15 морських свинках (чоловічої статі, маса тіла 270-320г), які були розділені на три групи. Кожна група складалася з 5 тварин: перша група контрольна (фізіологічний розчин), друга група - 0,07мл/кг рослинного екстракту, третя група - 0,14мл/кг рослинного екстракту. Підібрані дози перевищують добову дозу, рекомендовану для людини, в 10 і 20 разів відповідно. Дослідження показало, що 0,14мл/кг рослинного екстракту (у 20 разів більше добової терапевтичної дози для людини) не викликає анафілактичного шоку при в/м ін'єкції на 14-й і на 21-й день сенсibiliзації.

#### 3.6.2. Реакція гіперчутливості сповільненого типу

Дослідження було проведено на шкірі 15 морських свинок (чоловічої статі, маса тіла 260-310г) з білим шкірним покривом. Вони були розділені на три групи по 5 тварин в кожній: перша група - кон-

трольна, друга група - 0,007мл/кг рослинного екстракту, третя група - 0,035мл/кг рослинного екстракту. Вказані дози рослинного екстракту були розведені в стерильному фізіологічному розчині, потім змішані з повним ад'ювантом Фрейнда в пропорції 1:1, після чого введені тваринам. Відповідно до результатів попередніх досліджень, реакція гіперчутливості сповільненого типу на вказані дози рослинного екстракту у морських свинок була негативною.

Сорок дев'ять особин мишей гібрида F1 (CBA\*С57В16) (чоловічої статі, маса тіла 18-20г) були розділені на 7 груп, в кожній групі по 7 тварин. Миші були імунізовані підшкірною (п/к) ін'єкцією RCR (доза -  $2 \times 10$  кліток на мишу) в міжлопаткову область. Різниця в їх масі характеризує ступінь набряку і інтенсивність реакції гіперсенситибілізації сповільненого типу. Показник реакції було підраховано згідно з формулою:

$$U = (P_0 - P_{\text{контроль}} / P_{\text{контроль}}) \times 100$$

де  $P_0$  - маса в експериментальній групі, а  $P_{\text{контроль}}$  - маса в контрольній групі

Дані аналізу доводять, що тестовані дози рослинного екстракту, тобто 0,18 і 0,07мл/кг, не вплинули на формування реакції гіперчутливості сповільненого типу у мишей, або на формування клітинного імунітету. Таким чином, результати експериментів показали, що рослинний екстракт не має імунотоксичних властивостей.

3.6.3. Вплив на масу і кількість клітин підколіних лімфатичних вузлів у мишей

Для оцінки алергенних властивостей рослинного екстракту був застосований метод спостереження за зміною маси і числа підколіних лімфатичних вузлів у мишей у відповідь на антигенний подразник, так званий "тест підколіних лімфатичних вузлів" (PLNA). Десять мишей гібрида F1 (CBA\* С57В16)(чоловічої статі, маса тіла 18-20г) піддалися введенню 50мкл стерильного фізіологічного розчину (контроль), та інші десять - 0,07мл/кг рослинного екстракту.

Через 7 днів були визначені маса та клітинність правого і лівого підколіних лімфатичних вузлів. Відносний показник був визначений шляхом ділення показника для лівого лімфатичного вузла на показники для правого вузла. Відносний показник маси і клітинності лімфатичних вузлів для експериментальної і для контрольної групи був рівний 0,95 і 0,98. Таким чином, оцінка впливу рослинного екстракту на масу і клітинність лімфатичних вузлів виявила, що препарат не володіє алергенними властивостями.

#### 3.6.4. Імунотоксичний ефект

Дослідження різних імунотоксичних властивостей рослинного екстракту було виконано у відповідності з рекомендаціями ВОЗ. Вплив рослинного екстракту на гуморальну імунну відповідь визначався по числу продукуємих антитіл кліток в селезінці по методу Ерне. Вплив рослинного екстракту на клітинний імунітет визначався реакцією гіперсенситибілізації сповільненого типу у мишей. Відповідно до рекомендацій Робочої Конференції в Арлінгтоні, був виявлений вплив препарату на клітинність селезінки у відповідь на антигенну стимуляцію.

3.6.5. Вплив на кількість антитілоутворюючих клітин в селезінці мишей

Для дослідження впливу рослинного екстракту на кількість антитілоутворюючих клітин в селезінці мишей було застосовано прямий метод локального гемолізу. Він допомагає визначити клітки, що формують імуноглобулін М з високою гемолітичною активністю. Було відібрано сорок дев'ять мишей гібрида F1 (CBA\* С57В16)(чоловічої статі, маса тіла 18-20г). Миші були розділені на 7 груп, в кожній групі по 7 тварин. Миші були імунізовані еритроцитами барана (SRBC) за допомогою в/в ін'єкції. На четвертий день після імунізації була визначена кількість антитілоутворюючих колоній (AFC) в селезінці мишей (по методу Ерне). Отримані результати дозволили зробити висновок, що рослинний екстракт не впливає на кількість антитілоутворюючих колоній в селезінці мишей, імунізованих еритроцитами барана в належних дозах і по належній схемі, і, відповідно, не впливає на первинну імунну відповідь.

3.6.6. Вплив на кількість ядровмісних клітин в селезінці мишей

Дослідження було проведено на 49 мишах F1 (CBA\* С57В16; чоловічої статі, маса тіла 18-20г). Тварини були розділені на 7 груп, в кожній групі по 7 мишей. Вони були імунізовані еритроцитами барана, введеними в/у в дозі  $5 \times 10^8$  кліток на мишу. Результати показали, що разова в/м ін'єкція мишам рослинного екстракту не впливає на клітинність селезінки у випадках, коли дози препарату, рівні 0,18 і 0,07мл/кг, вводилися як напередодні імунізації, так і в день її виконання, так і через добу після неї.

#### 3.7. Висновок

Підводячи підсумки результатам дослідження рослинного екстракту, що розглядається як імуномодулюючий препарат, на наявність у нього токсичних властивостей, ми відзначили, що препарат нешкідливий при разовому в/м введенні лабораторним тваринам і добре засвоюється організмом щурів Вістара і собак.

Проведене дослідження показало, що разові в/м ін'єкції мишам (миші BALB/c) рослинного екстракту, розведеного 1:10 у фізіологічному розчині, в дозах 0,5-1,0мл на особину не викликали інтоксикації і смерті тварин. Збільшені дози препарату (розведеного 1:10 у фізіологічному розчині, в дозах 1,5-2,0мл на особину, 75-100мл/кг) привели до пониження рухової активності і пригніченому стану тварин, але смерть при цьому не спостерігалася.

Внутрішньом'язові і в/о ін'єкції мишам BALB/c рослинного екстракту, розведеного 1:5 у фізіологічному розчині, супроводжувалися вираженим пригніченим станом тварин, наркозом і сном. Інтоксикація тварин рослинним екстрактом на рівні ЛД50 була схожа з отруєнням етиловим спиртом, який входить до складу препарату.

Відповідно до значення ЛД50 рослинний екстракт може бути класифікований як що належить до групи безпечних препаратів у разі в/м введення 51-66мл/кг препарату, розведеного 1:5 у фізіологічному розчині. В той же час в умовах щоденного введення не було відмічено ніяких значних специфічних або статевих відмінностей в чутливості до

препарату у щурів Вістара, що одержували щодня протягом 3 місяців в/м ін'єкції в дозах 0,07 і 0,21мл/кг, і у собак, що одержували щодня протягом 1 місяця в/м ін'єкції рослинного екстракту в дозах 0,07мл/кг. Відмічені дози препарату для ін'єкцій були розведені 1:10 в стерильному фізіологічному розчині. Дози рослинного екстракту, випробувані на мишах і собаках в умовах щоденного введення, перевищували добові терапевтичні дози для людини (0,5мл на людину або 0,007мл/кг) в 10 і 30 разів.

Результати дослідження показали, що дози 0,07 і 0,21мл/кг рослинного екстракту в умовах щоденного введення мишам протягом 3 місяців, і 0,07мл/кг в умовах постійного введення собакам протягом місяця були добре засвоєні тваринами і не вплинули на їх гематологічні показники і на функціональний стан головних органів досліджуваних тварин (за даними біохімічних аналізів і ЕКГ). Відсутність токсичного пошкодження внутрішніх органів і загальних і місцевих токсикоалергічних реакцій, пов'язаних з дією рослинного екстракту, було підтверджено результатами патоморфологічного дослідження, проведеного після закінчення експерименту з щоденним введенням препарату. Також не спостерігалось місцевого дратівливого дії препарату при його щоденному тривалому введенні мишам і собакам в дозах 0,07 і 0,21мл/кг при розведенні 1:10 у фізіологічному розчині. Відповідно до вимог Державного Фармакологічного Комітету Міністерства охорони здоров'я було проведено дослідження мутагенних властивостей рослинного препарату.

Крім того, ми вивчили здатність препарату викликати генні мутації в тестовій культурі *Salmonella typhimurium* (з допомогою проби Еймса), стимулювати хромосомні абберации в клітинах кісткового мозку мишей гібрида F1(CBA\*C57B16), впливати на число домінуючих летальних мутацій в клітках ембріонів мишей і впливати на систему відновлення ДНК *E. coli* PQ 37 з допомогою SOS-хромотесту.

В період дослідження було встановлено, що рослинний екстракт не володіє мутагенними властивостями.

У дозі 0,21мл/кг (що в 30 разів перевершує дозову дозу, рекомендовану для людини) рослинний екстракт уповільнює збільшення маси тіла вагітних щурів при в/м введенні з першого по 20-й день вагітності, а також зменшує тривалість вагітності, число живих плодів, місць імплантації, жовтих тіл і маси тіла ембріонів. В той же час показник передімплантаційної загибелі був значно нижчий у мишей, що одержували 0,21мл/кг рослинного препарату протягом вагітності, ніж у контрольних мишей, і рівень післяімплантаційної загибелі був нижчий у першої групи.

Під час макроскопічного і мікроскопічного дослідження стандартних зрізів плодів (згідно з Вілсоном-Дібану), що піддалися дії 0,21мл/кг рослинного екстракту в пренатальному періоді, в 6,7% всіх випадків можна було говорити про недорозвинення плодів. Цей результат можна розцінити як порок ембріонального розвитку.

Аналіз з алізарином, необхідний для дослі-

дження розвитку кісткової системи у зародків щурів, виявив, що рослинний препарат в дозі 0,21мл/кг, що вводиться в пренатальному періоді, не викликає пороків розвитку скелета. Але в той же самий час спостерігалось запізнювання осифікації в більшості точок кальцифікації.

Під впливом в/м ін'єкцій рослинного екстракту в дозі 0,21мл/кг, що вводилося з першого по 20-й день вагітності, наголошувалось зменшення числа новонароджених щурів і збільшення числа мертвонароджених в порівнянні з контрольною групою. Маса тіла щурів, що піддалися дії рослинного екстракту в пренатальному періоді була нижча, ніж той же показник для контрольної групи. Результати досліджень розвитку народжених щурів не виходили за межі часових меж, типових для нормального розвитку даного виду тварин.

Таким чином, експерименти показали, що в/м ін'єкції рослинного екстракту в дозі 0,21мл/кг (що в 30 разів перевищує добову дозу для людини) з першого по 20-й день вагітності мали ембріотоксичний та тератогенний вплив на тварин. Таким чином, вагітність можна розглядати як протипоказання до призначення рослинного екстракту.

При щоденному в/м введенні 0,21мл/кг рослинного екстракту самцям щурів протягом 10 тижнів і самкам щурів протягом 2 тижнів не було виявлено впливу препарату на репродуктивну функцію тварин.

Вивчення алергенних властивостей рослинного екстракту на морських свинках показало, що 5-кратне в/м введення рослинного препарату в сенсibiliзаційних дозах 0,07 і 0,14мл/кг і в/п введення встановленої дози рослинного екстракту 0,14мл/кг на 14 і 21 день після сенсibiliзації не привело до розвитку анафілактичного шоку.

Рослинний екстракт, що вводиться у встановлених дозах по схемі сенсibiliзації, не мав алергенного ефекту в реакції гіперсенсibiliзації сповільненого типу у морських свинок і в реакції підколіних лімфовузлів у мишей.

У дозах 0,07мл/кг і 0,18мл/кг рослинний екстракт не впливав на кількість антитілоутворюючих і ядромісних клітин в селезінці і не впливав на реакцію гіперсенсibiliзації у мишей. Дані свідчать про відсутність негативного впливу рослинного препарату на гуморальний і клітинний імунітет, тобто, про відсутність у препараті імунотоксичності.

Нарешті, з огляду на всі проведені експерименти та отримані результати, рослинний екстракт рекомендовано для клінічних випробувань з єдиним протипоказанням - вагітність.

Приклад 4. Фармакологічні ефекти рослинного препарату

Дослідження проводилися з метою визначення можливої дії рослинного екстракту на пацієнтів.

Перше дослідження було виконано в 2000 році. Його було розроблено як клінічне випробування, і головною метою даного проекту було визначення токсичності або побічних ефектів рослинного препарату у ВІЛ-інфікованих пацієнтів, а іншою метою було визначення можливої ефективності рослинного екстракту при дії його на перебіг хвороби і на гуморальний, клітинний і неспе-

цифічний імунітет ВІЛ-інфікованих осіб.

Для дослідження були відібрані пацієнти від 16 до 40 років з позитивною реакцією на ВІЛ і з високим ризиком розвитку СНІДу. Ці пацієнти одержували рослинний екстракт протягом 80 днів. У даному проекті 0,4мл рослинного екстракту розлучалося фізіологічним розчином до 4мл і вводилося щодня в/м і в/в. Протягом цього періоду пацієнти проходили щоденне обстеження, всі результати були зафіксовані. Після лікування протягом 3 місяців були досліджені лабораторні дані всіх пацієнтів. Був визначений відсоток CD4 Т-лімфоцитів:  $21 \pm 1\%$  в перший день дослідження,  $23 \pm 1,5\%$  після 30 днів терапії рослинним екстрактом,  $32 \pm 0,8\%$  після 60 днів терапії,  $32 \pm 0,7\%$  після 80 днів терапії і  $39 \pm 1,6\%$  через три місяці після закінчення курсу терапії. Ці дані показують збільшення кількості CD4 Т-лімфоцитів за час лікування рослинним екстрактом. Відсоток CD8 Т-лімфоцитів у пацієнтів складав  $25 \pm 1,5\%$  в перший день дослідження,  $24 \pm 1,5\%$  після 30 днів терапії рослинним екстрактом,  $22 \pm 0,8\%$  після 60 днів терапії і після 80 днів терапії він складав  $23 \pm 0,8\%$ . У подальші три місяці після закінчення курсу терапії він складав  $20 \pm 2\%$ .

Відсоток Т-лімфоцитів, включаючи CD95, складав  $40 \pm 9,2\%$  в перший день дослідження,

$47 \pm 2\%$  після 30 днів терапії рослинним екстрактом,  $25 \pm 1,4\%$  після 60 днів терапії,  $30 \pm 1,3\%$  після 80 днів терапії, і через три місяці після закінчення терапії він складав  $25 \pm 1,5\%$ . Статистичне порівняння першого і 80-го дня після терапії рослинним екстрактом показало чітко виражену різницю в кількості CD4, CD8 і CD95 Т-лімфоцитів ( $P < 0,01$ ).

Наступне дослідження було проведено для встановлення ранніх і пізніх побічних ефектів рослинного екстракту у хворих СНІДом і у ВІЛ-інфікованих осіб. У даному проекті були відібрані шість добровольців з позитивною ВІЛ-реакцією. Критерії включення були наступними: ВІЛ-позитивні пацієнти з важкою грибовою або іншою опортуністичною інфекцією, зменшенням маси тіла більше 10%, вторинний герпес, лихоманка довше за один місяць. Після відбору пацієнтів і почала проекту були зміряні початкові лабораторні показники, які потім визначалися щонеділі.

0,4мл рослинного екстракту набиралося в 5-мл шприц, розлучалося 3,5мл теплої фізіологічного розчину і вводилося в/м протягом двох днів, після чого в/в протягом ще двох днів. Після завершення введення пацієнтів обстежували на наявність побічних ефектів і проявів, пов'язаних із СНІДом, клінічних ознак і симптомів. Дані наведено в таблиці 12.

Таблиця 12

Клінічні дані, одержані в другому клінічному випробуванні рослинного екстракту на шести добровольцях

№	Вік	Стать	Вага	CD4 % перед	CD4 3-й місяць	CD4 підраховано перед	CD4 підраховано на 3-му місяці	CD8 % перед	CD8 3-й місяць	CD8 підраховано перед	CD8 підраховано на 3-му місяці
1	38	ч	76	2	12	28	260	62	62	881	1345
2	42	ч	63	21	21	177	318	58	56	490	894
3	48	ч	56	22	23	352	636	15	47	688	799
4	23	ч	67	22	23	350	360	23	38	318	574
5	23	ж	54	24	41	352	651	41	43	632	683
6	28	ч	56	19	51	221	1273	51	25	252	624
Середнє	33,6		62	17,5	27,1	247	517	40	45	543	812
P*				0,04		0,02		0,1		0,02	

\*Р-значення знаково-рангового критерію Вілкосона

Наступне дослідження проводилося для порівняння ефективності відновлення імунологічних показників і розвитку ранніх побічних ефектів у хворих СНІДом, що одержував рослинний екстракт і у хворих, що пройшли стандартну терапію ВААРТ. Пацієнти були випадковим чином розбиті на дві групи, в одній з яких проходили лікування рослинним екстрактом, в іншій - ВААРТ (у 4 блоках випадкової вибірки). У двох пацієнтів виявилася нестерпність ВААРТ, і тому вони були переведені в групу терапії рослинним екстрактом. Критеріями включення в дослідження були наступні: ВІЛ-позитивна реакція, важка грибова або опортуністична інфекція на момент дослідження або раніше, зменшення маси тіла більш ніж на 10%, вторинний герпес, лихоманка довше за один місяць і малі опортуністичні інфекції. Пацієнти не повинні були приймати які-небудь ліки проти СНІДу або препарати, стимулюючи імунну систему. Проте

антибіотики і інші препарати для лікування проявів СНІДу заборонений не був. Після відбору пацієнтів і почала дослідження були зміряні лабораторні показники, такі як клінічний аналіз крові, тригліцериди, холестерин, сечова кислота, креатинін, азот сечовини кров, лужна фосфатаза, аспартатаміно-трансфераза, аланінаміно-трансфераза, глюкоза крові натщесерце, РНК-ВІРУСНАЯ навантаження

CD4 (Th1 Th2), CD4/CD8, CD8, загальний аналіз сечі і посів сечі; дані показники вимірювалися перед початком лікування і через 1, 2 і 3 місяці після лікування.

Всіх пацієнтів обстежили для визначення побічних ефектів препарату і пов'язаних із СНІДом клінічних ознак і симптомів. Дані було зафіксовано у відповідних формах. Було обстежено 16 пацієнтів з групи з рослинним екстрактом і 11 - з групи ВААРТ. Порівняння даних обох груп наведено в таблиці 13.

Таблиця 13

Порівняння двох досліджених груп (WBC - лейкоцити)

Змінна	Рослинний екстракт	ВАПРТ	Значення Р
Вік (Середній, д.в.)	34,9 (8,1)	38,6	0,4
Стать ж/ч	4/12	0/11	0,12
Вага	62,2 (8)	57,3 (8)	0,3
CD4 % (Середнє, д.в.)	14,0 (6,0)	18,3 (13)	0,5
CD4 кількість (Середнє, д.в.)	227 (90)	239 (136)	0,8
CD8 % (Середнє, д.в.)	39,3 (28,1)	48,6 (30,1)	0,6
CD8 кількість (Середнє, д.в.)	686 (538)	624 (408)	0,8
WBC(Середнє, д.в.)	5500 (3238)	4662 (667)	0,8
Лімфоцити % (Середнє, д.в.)	35,5 (12,2)	31,0 (9,0)	0,5
Вірусне навантаження (Середнє, д.в.)	2161721 (1278272)	270983 (228802)	0,4

Дані в таблиці 14 показують, що кількість CD4 зросло в обох групах, але між групами не було значної різниці.

Таблиця 14

Порівняння процентного співвідношення CD4, CD8, лейкоцитів (WBC) і лімфоцитів в обох досліджуваних групах.

Змінна	Рослинний екстракт	ВАПРТ	Значення Р
CD4 % (Середнє, д.в.)	17,2 (6,6)	26,2 (8,6)	0,02
CD4 кількість (Середнє, д.в.)	349 (232)	470 (191)	0,21
CD8 % (Середнє, д.в.)	39,5 (20,5)	30,4 (19,4)	0,3
CD8 кількість (Середнє, д.в.)	871 (910)	507 (303)	0,4
WBC(Середнє, д.в.)	5242 (1819)	4900(222)	0,2
Лімфоцити % (Середнє, д.в.)	38,1 (7,7)	38,2 (5,3)	0,5

Таблиця 15 показує різні дані в групі пацієнтів, що одержували рослинний екстракт. Очевидно і не викликає сумніву збільшення відсотка CD4.

Таблиця 15

Порівняння процентного співвідношення CD4, CD8, лейкоцитів і лімфоцитів в групі, що одержувала рослинний екстракт, на початку і в кінці дослідження

Змінна	Рослинний екстракт (початок)	Рослинний екстракт (кінець)	Значення Р
CD4 % (Середнє, д.в.)	14,0 (6)	17,2 (6,6)	0,01
CD4 кількість (Середнє, д.в.)	227 (90)	349 (232)	0,002
CD8 % (Середнє, д.в.)	39,3 (28,1)	39,5 (20,5)	0,9
CD8 кількість (Середнє, д.в.)	686 (538)	871 (910)	0,3
WBC* (Середнє, д.в.)	5500 (3238)	5242 (1819)	0,4
Лімфоцити % (Середнє, д.в.)	35,5 (12,2)	38,1 (7,7)	0,06

\*WBC - лейкоцити

Приклад 5: Визначення максимально прийнятної дози рослинного екстракту

Дане дослідження проводилося для визначення максимально прийнятної дози (МПД) рослинного екстракту у ВІЛ-інфікованих пацієнтів і його можливих побічних ефектів і токсичності, які можуть вплинути на обмеження дози (токсичність, що обмежує дозу).

Протокол дослідження базувався на методі підвищення доз. Паралельно оцінювався вплив рослинного екстракту на вірусне навантаження і кількість CD4 у пацієнтів. Були вибрані чотири групи пацієнтів (по 3 пацієнти в кожній), після чого протягом 28 днів (4 тижні) вони проходили курс терапії підвищеними дозами екстракту. Базова доза екстракту була прийнята ЛД10 (10% від летальної дози), встановленої на тваринах в минулих експериментах. Згідно протоколу, пацієнти були ретельно

обстежені на предмет ознак і симптомів побічних ефектів і токсичності, що включало фізичне і лабораторне дослідження.

Всі пацієнти були чоловіками у віці 28-60 років (середній вік 41,6 років). У першій групі добова доза 2мл екстракту, розведення 100мл теплового фізіологічного розчину, вводилася внутрішньовенно протягом 0,5-1 години щодня 28 днів. За винятком підвищеного потовиділення і пониження маси тіла у 2 пацієнтів, токсичності або серйозних побічних ефектів не спостерігалось. У другій групі інші три пацієнти одержували денну дозу 4мл. У цій групі не було виявлено жодних побічних ефектів і токсичності. У третій групі, що спочатку включала 4 пацієнти, один пацієнт був виключений у зв'язку з відмовою і неможливістю щодня одержувати добову дозу 6,7мл. У цій групі було відмічено відсутність значної токсичності, що обмежує дозу, і

мінімальних побічних ефектів. У четвертій групі троє пацієнтів одержували щоденну дозу в 10мл, і в цій групі також не було виявлено значних побічних ефектів і токсичності.

Таким чином, в дослідженні взяли участь 12

пацієнтів, що протягом 4 тижнів проходили курс лікування підвищеними дозами рослинного екстракту. У всіх чотирьох групах не було виявлено ні токсичності, ні побічних ефектів.