

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

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук,
профессор
Орбещ Владимир Александрович

Ставрополь – 2020

Оглавление

	Введение	3
1.	Обзор литературы	8
1.1.	Перспективы направленного транспорта лекарственных средств	8
1.2.	Токсикологические свойства систем доставки лекарственных веществ на основе микро- и наночастиц	23
1.2.1.	Металлические наночастицы	24
1.2.2.	Наночастицы неметаллических веществ	28
1.2.3.	Наночастицы полимерных материалов	29
1.3.	Применение экзосомальных и хитозановых частиц при конструировании фармацевтических композиций	34
2.	Собственные исследования	41
2.1.	Материалы и методы исследований	41
2.2.	Результаты исследований	50
2.2.1.	Разработка и изучение фармакокинетических свойств селективных препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц	50
2.2.2.	Изучение фармако-токсикологических свойств препаратов «Экказит» и «Хитазит» на лабораторных животных	59
2.2.2.1.	Определение острой токсичности препарата «Экказит» на белых мышах и крысах при внутрижелудочном введении	59
2.2.2.2.	Определение острой токсичности препарата «Хитазит» на белых мышах и крысах при внутрижелудочном введении	62
2.2.2.3.	Исследование субхронической пероральной токсичности препаратов «Экказит» и «Хитазит» на белых крысах	66
2.2.2.4.	Изучение алергизирующих и раздражающих свойств препаратов «Экказит» и «Хитазит» на морских свинках	72
2.2.2.5.	Изучение пирогенных свойств препаратов «Экказит» и «Хитазит» при внутрибрюшинном введении кроликам	79
2.2.3.	Изучение клинико-терапевтической эффективности препаратов «Экказит» и «Хитазит»	82
	Заключение	96
	Выводы	102
	Практические предложения	104
	Перспективы дальнейшей разработки темы	104
	Список литературы	106
	Приложения	133

ВВЕДЕНИЕ

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., Myung Soo Kim., 2015; Singh R. et al., 2011; Alvarez-Erviti L. et al., 2011; Tan Y. L. et al., 2009; Kim J. H. et al., 2008; Chan H. K., 2011; Свирщевская Е. В. с соавт., 2012; 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 E. 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 клинико-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 свой-

ства, 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 клинико-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, клинико-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 клинико-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 «Экказит» и «Хитазит» безопасны по токсикологическим параметрам, не обладают аллергенными, раздражающими и пирогенными свойствами.

3. Применение при острой катаральной бронхопневмонии ягнят препаратов «Экказит» 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 сертифицированном 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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Перспективы направленного транспорта лекарственных средств

В последние десятилетия в качестве альтернативного способа повышения эффективности и безопасности препаратов используется основанный на нанотехнологиях синтез терапевтических средств. Еще в 1909 году Пауль Эрлих и его коллеги впервые представили концепцию таргетирования лекарств или доставки лекарств по конкретным участкам. (Bosch and Rosich, 2008). В 2004 году Европейский научный фонд в области исследований направленной доставки лекарств выдвинул концепции наномедицины (Reis et al., 2007). Концепция доставки лекарств как неинвазивной системы недавно стала высококонкурентной и быстро развивающейся технологией для лечения заболеваний различного генеза. В качестве средств доставки действующих веществ считаются перспективными наночастицы, дендримеры, углеродные трубки, квантовые точки, полимерные наноматериалы, хитозан, различные белки, нуклеотиды, экзосомы и т. д. Одной из основных проблем фармакотерапии является селективное воздействие препарата на патологический очаг, чтобы избежать потенциальных побочных эффектов для организма в целом. Наномодификация существующих препаратов позволяет облегчить доступ в забарьерные органы, онкоклетки, инфицированные ткани (Zhang et al., 2013).

Применение фармакокинетического моделирования в области разработки лекарств по существу, позволяет разработать количественное описание временного поведения интересующего соединения на уровне ткани/органа путем выявления и определения зависимости между дозой лекарственного средства и переменными (Kim et al., 2010, Wang et al., 2012). Чтобы понять и охарактеризовать фармакокинетику лекарственного средства, часто бывает полезно использовать фармакокинетическое моделирование с использованием эмпирических или механистических подходов. Фармакокинетические модели могут быть разработаны в рамках математического и статистического коммерческого программного обеспечения, такого как MATLAB, с использованием традиционного математического и вычислительного кодирования или с использованием

Simbiology Toolbox, доступного в MATLAB, для подхода с графическим пользовательским интерфейсом в разработке фармакокинетических (РВРК) моделей (Byrne et al., 2008; Pattni et al., 2015). Использование систем доставки лекарственных веществ является привлекательным подходом для облегчения захвата терапевтических агентов в желаемом месте действия, особенно когда свободное лекарство имеет плохую фармакокинетику или значительную внешнюю токсичность. Успешное использование в клинической практике зависит от глубокого понимания поведения носителя *in vivo*, что по большей части труднодостижимо. Это, по крайней мере частично, связано со значительными различиями в механизмах контроля фармакокинетики для классических препаратов и селективных препаратов. В фармацевтической промышленности биодоступность – это отношение вводимого препарата к количеству препарата, достигшего системного кровотока. Когда препарат вводят внутривенно, его биодоступность составляет 100 %. Разработанные методом рационального дизайна препараты проходят доклинические и клинические испытания, и только при успешных результатах их выпускают на рынок (Farokhzad and Langer, 2009; Zhang et al., 2013; Allen and Cullis, 2013).

Аналитический обзор BCC Research о биотехнологических исследованиях, опубликованный в апреле 2019 года, свидетельствует об уверенном внедрении нанотехнологий в глобальный рынок фармацевтического производства. Так, темп роста мирового рынка квантовых точек и углеродных нанотрубок составляет 41,3 и 33,4 % соответственно. Мировой рынок экзосомной диагностики и терапии в 2016 и 2018 годах составлял \$16,1 и \$34,7 млн соответственно, по прогнозам к 2021 он вырастет до \$111,8 млн, а к 2023 году до \$186,2 млн, что соответствует совокупному годовому темпу роста в 47,3 %. При этом глобальный рынок для индустрии экзосом к 2023 году должен достичь \$180,0 млн (в 2018 году он составлял \$25 млн) при совокупном годовом темпе роста в период 2018–2023 годов 48,4 %. Глобальный рынок хитина и хитозана в 2016 году равнялся \$2,0 млрд, а к 2021 году должен достичь \$4,2 млрд при совокупном годовом темпе роста 15,4 %. Согласно BCC Research

(www.bccresearch.com/market-research/pharmaceuticals/advanced-drug-delivery-markets-phm006j.html), общемировой доход от внедрения систем доставки лекарственных средств в 2018 году составил в \$212,8 млрд долл. США, что демонстрирует совокупный годовой темп роста 3,2 %. Согласно подтвержденным исследованиям рынка, опубликованным BCC Research в августе 2019 года, глобальный рынок систем селективной доставки легочных лекарств в 2018 году был оценен в 39,97 млрд долл. США и по прогнозам к 2026 году достигнет 58,07 млрд долл. США, увеличившись в среднем на 4,8 % (<https://www.bccresearch.com/market-research/pharmaceuticals/advanced-drug-delivery-systems-tech-markets-report.html>).

Глобальный спрос способствует развитию разнообразия подходов при синтезе наноматериалов для селективной доставки лекарственных веществ.

В поисках лучших систем доставки исследователи разработали различные материалы как органического, так и неорганического происхождения, обладающие уникальными физико-химическими свойствами (Farokhzad and Langer, 2009). Клеточное поглощение лекарств может быть увеличено путем присоединения нацеливающих лигандов или изменения формы, размера и свойств поверхности наночастиц (Suntres Z. E. et al., 2013). Основные преимущества наноносителей и систем заключаются в том, что они повышают эффективность современной доставки лекарств путем введения нового класса терапевтических средств с ультраточной обработкой и преодолевают трудности, связанные с традиционными методами, путем уменьшения побочных эффектов. В последние десятилетия особое внимание уделялось адресной доставке лекарств, что повышает селективность и уменьшает побочные эффекты, связанные с избыточным распределением лекарств (Suntres Z. E. et al., 2013).

Основной принцип действия адресной доставки лекарств объясняется на рисунке 1. Молекулы лекарственного средства прикрепляются к наночастицам, выступающим в качестве носителя, посредством физико-химического взаимодействия, затем к конъюгату лекарственное средство-наночастица присоеди-

ется направляющая молекула (антитело или лиганды), которая направляет его к рецепторам/антигенам на поверхности целевых клеток.

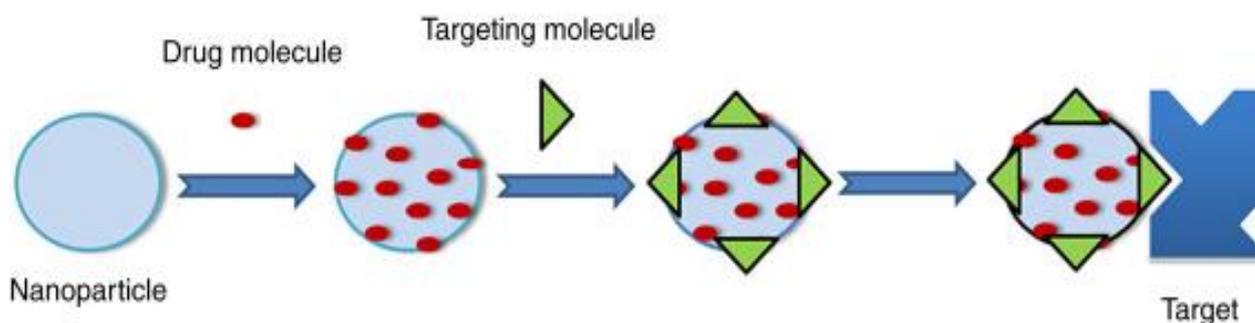


Рисунок 1 – Основные этапы адресной доставки лекарственных средств (Rapoport, 2007)

В сравнении с традиционными аналогами лекарственных средств наноматериалы позволяют разрабатывать новые лекарственные формы с улучшенной эффективностью, обладающие минимумом побочных эффектов (Irvine, 2011; Janib et al., 2010; Wang et al., 2012). Установлено, что наноматериал улучшает биодоступность и эффективность при низкой цитотоксичности за счет увеличения времени циркуляции в крови, контролируемого высвобождения и селективного подхода (Kayal and Ramanujan, 2010; Kim et al., 2010; Yao et al., 2014).

В настоящее время успешно разработаны экономически эффективные противоопухолевые препараты, в основном на основе липосом (Koning et al., 2010; Allen and Cullis, 2013; Malam et al., 2009) и полимеров (Rapoport, 2007). Липосомы представляют собой сферические коллоидные структуры, образованные путем самосборки липидных бислоев (Samad et al., 2007). Липосомные системы доставки изменяют кинетику лекарственных средств (Al-Jamal and Kostarelos, 2011; Lao et al., 2013). Липосомная доставка лекарств бывает двух типов: активная или триггерная (Pattni et al., 2015). При активной доставке липосомных лекарств (Byrne et al., 2008; Danhier et al., 2010) модификация поверхности липосомы осуществляется лигандом и антителами, тогда как при инициированной доставке (Rijcken et al., 2007; Shum et al., 2001) происходит

чувствительное к стимулам высвобождение лекарственного средства. Известно, что липосомальная инкапсуляция молекул лекарственного средства снижает кардиотоксичность при раке молочной железы (Sharma et al., 2006; Suntres Z. E. et al., 2013).

Разработка наноразмерных полимерных мицелл открывает совершенно новый метод адресной системы доставки лекарств (Nasongkla et al., 2006). Небольшой размер, гидрофобная загрузка лекарств, длительное время циркулирования в крови, биоразлагаемость, меньшая токсичность и стабильность *in vivo* делают их подходящими кандидатами для направленной доставки лекарственных средств (Uhrich et al., 1999; Sutton et al., 2007).

За последнее десятилетие было разработано множество гибридных систем доставки, объединённых с целью повышения эффективности нескольких средств, так, например, комбинируют частицы из газонасыщенного раствора ибупрофена с различными наноносителями, такими как поллоксамеры, гелуцир и глицерилмоностеарат (Fraile et al., 2013). Данный метод предоставляет широкие возможности для разработки новых гибридных систем для гидрофобных лекарств с контролируемым высвобождением.

Графен представляет собой единый слой двумерной сети атомов углерода (Новоселов и др., 2012), обладающий уникальными свойствами, которые являются перспективными для биомедицинских применений (Wang et al., 2011). После прокатки графена образуются структуры, похожие на одностенные углеродные нанотрубки с открытым концом (Hersam, 2008). Делокализованный π -электрон на поверхности графеновых пластин может быть использован для связывания препаратов, имеющих ароматическую структуру, посредством π - π -упаковки (Liu et al., 2013). За счет большого отношения площади поверхности к объему обеспечивается высокая загрузка лекарств (Yang et al., 2008; Liu et al., 2007). Доказано повышение эффективности белковой, пептидной и ДНК-терапии в комплексе с углеродными нанотрубками за счет повышения растворимости в биологических жидкостях, что улучшает диффузию через клеточные мембраны (Lacerda et al., 2007; Chen et al., 2008).

Для создания многофункциональных наноносителей путем включения двух или более материалов, таких как лекарственное средство, маркер и нацеливающий элемент (лиганд или антитела), также используются неорганические наночастицы (Liang et al., 2014; Heneweer et al., 2012; Ma et al., 2015; Sao et al., 2015). Лучший пример – наночастицы золота, их поверхность и размер можно легко изменить, чтобы сделать их совместимыми с необходимыми антителами как для визуализации, так и для целевой доставки лекарств (Dreaden et al., 2012). Магнитные наночастицы с подходящим флуоресцентным красителем и покрытием биоразлагаемым полимером (ПЭГ, хитозан и т. д.) используются как для визуализации, так и для целевого воздействия на клетки (Veiseh et al., 2010). Liong et al. (2008) синтезировали неорганические функциональные наночастицы для специфической системы доставки гидрофобных лекарственных средств к раковым клеткам с возможностью двойной визуализации (как оптического, так и магнитного резонанса). Они включили суперпарамагнитный нанокристалл оксида железа в наночастицы мезопористого диоксида кремния для магнитно-резонансной томографии и магнитных манипуляций, ими также произведена модификация поверхности наночастиц кремнезема флуоресцентным красителем, нацеливающими лигандами, а поры заполнялись молекулами лекарственного средства.

Нульмерные люминесцентные полупроводниковые нанокристаллы, обладающие универсальной поверхностью, позволяющей им связываться практически с любой системой доставки лекарств, называются квантовыми точками (Qi and Gao, 2008; Wang and Chen, 2011; Zrazhevskiy et al., 2010). Они используются для мониторинга селективности (Delehanty et al., 2009), а также для специфического высвобождения лекарств (Gao et al., 2005; Smith et al., 2008). Использование квантовых точек сводится к включению их в ядро оптически или магнитно-активных наночастиц, таких как наночастицы оксида золота или железа (Probst et al., 2013; Shiohara et al., 2004). Биоконъюгированные квантовые точки позволяют хирургам картировать пораженную область, что способствует ее удалению хирургическим путем (Bagalkot et al., 2007; Luo et al., 2012; Al-

Jamal et al., 2008; Li et al., 2011). Квантовые точки из кадмия с подходящей поверхностью и флуоресценцией делают их многообещающими кандидатами для использования в качестве системы доставки лекарственных средств с выраженными селективными свойствами (Gadery et al., 2011), а квантовые точки из графена могут быть использованы для визуализации и терапии рака поджелудочной железы (Nigam et al., 2014).

С момента открытия и до начала XXI века биовезикулам не придавали особого значения, но как только было доказано непосредственное участие их в межклеточной коммуникации, у многих ученых мира открылся неподдельный интерес к изучению экзосом. К экзосомам, как правило, относят фракцию мембранных везикул диаметром 40–100 нм, которые секретируются в межклеточное пространство различными типами клеток тканей и органов. Экзосомы имеют сложное тканеспецифическое органическое строение, в том числе биоактивные липиды (Record et al., 2014), белки (Fontana et al., 2013), цитокины, факторы роста, мессенджерные РНК (мРНК) и некодирующие транскрипты, например микроРНК (миРНК) (Braicu et al., 2015). Микровезикулы встречаются в разных биологических жидкостях (бронхоальвеолярный лаваж, сыворотка, моча, грудное молоко, спинномозговая жидкость, слюна, злокачественные плевральные выпоты и др.) как при нормальном функционировании организма, так и при возникновении различных заболеваний. Известно, что экзосомы принимают активное участие во многих физиологических процессах (морфогенез, гемостаз, иммунный контроль и др.), начиная с эмбриогенеза и заканчивая старением организма. Основная физиологическая роль мембранных везикул заключается в транспортировке веществ из клеток во внеклеточное пространство, с доставкой их в клетки отдаленных тканей и органов. Расширение разрешающих возможностей наблюдения и анализа наноразмерных частиц за последние 20 лет способствовало увеличению интереса к исследованию микровезикулярного межклеточного транспорта. Сегодня экзосомы повсеместно признаны мощными далекодействующими медиаторами, играющими существенную роль в поддержании стволовых клеток, пролиферации и апоптозе клеток, восстановлении

тканей, ангиогенезе и иммунном ответе (El-Andaloussi et al., 2012; Barkalina et al., 2015). Установлено, что экзосомы высвобождаются В- и Т-лимфоцитами, тромбоцитами, дендритными клетками, мастоцитами и лаброцитами, а также клетками эпителия. Они обеспечивают транспортировку белков, липидов и нуклеиновых кислот в органах и системах, минуя плазматическую мембрану, что позволяет использовать их в качестве контейнеров для адресной доставки лекарственных средств к клеткам-мишеням (Suntres Z. E. et al., 2013).

Литературные данные указывают, что основная часть исследований терапевтической эффективности экзосомальных препаратов направлена на онкопатофизиологию, болезнь Альцгеймера и Паркинсона. Молекулы вещества (микроРНК, мРНК, гормоны, ферменты, противоопухолевые соединения, антиоксиданты), интегрированные в экзосомы, обладают улучшенными фармакологическими характеристиками: повышается биологическая доступность, растворимость и стабильность препарата, снижается токсичность (Sun D., Zhuang X., Xiang X. et al., 2010; Dai S., Wei D., Wu Z. et al., 2008; Escudier B., Dorval T., Chaput N. et al., 2005; Núñez-Sánchez M. A., González-Sarrías A., Romo-Vaquero M. et al., 2015; Bandyopadhyay D., 2014).

Гетерогенность популяции мембранных везикул в плане физических, биохимических характеристик, а также присутствие в любой биологической жидкости молекул или субклеточных образований со схожими физическими или биохимическими характеристиками затрудняют широкое применение экзосом в клинической практике ввиду отсутствия единого стандартного метода выделения «чистого» продукта (Jeppesen D. K. et al., 2014; Tauro V. J. et al., 2013).

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 (Allan D. et al., 1980; Looze C., Yui D., Leung L. et al., 2009; Пат. RU 2556825). Наиболее широкое применение у исследователей получил протокол изоляции экзосом, который включает ультрацентрифугирова-

ние в градиенте плотности сахарозы (Théry C. et al., 2006). Отсутствие единого стандартного подхода получения экзосомальных дисперсий активно обсуждается в литературе, предпринимаются попытки стандартизации протоколов. В качестве дополнительного затруднения выступает тот факт, что ни качественный, ни количественный состав микровезикул не может быть строго специфичным. Следует отметить, что использование такого метода, как дифференциальное центрифугирование дисперсий микровезикул увеличивает риск их фрагментации на более мелкие осколки (Lawrie A. S. et al., 2009). В любой физиологической жидкости и в межклеточном пространстве, очевидно, одновременно могут присутствовать популяции субклеточных образований с размером в диапазоне 30–100 нм. Следовательно, размер экзосом не является абсолютным критерием их отличия, так как в указанном диапазоне могут быть обнаружены как вирусы, так и белковые комплексы. Для изучения эффективности секретлируемых мембранных везикул имеет большое значение исследование отдельных популяций везикул. Помимо мембранных везикул биологические жидкости также могут содержать большое количество включений, размеры которых близки (экзосомы схожи по размеру с вирусами и липопротеинами, размер остальных микровезикул совпадает с размером бактерий) или молекулы с тенденцией к образованию агрегатов или комплексов (Escudier B., Dorval T., Charput N. et al., 2005). Присутствие подобных включений может не только существенно затруднить обнаружение мембранных везикул, но и способствовать их совместному осаждению с различными популяциями искомых частиц. Таким образом, из всего многообразия исследованных мембранных везикул экзосомы представляют собой частицы, обладающие наиболее подходящими характеристиками, которые позволяют их использовать в качестве несоразмерного средства доставки лекарственных веществ при обеспечении необходимого контроля качества препарата на стадии пробоподготовки (Dai S., Wei D., Wu Z. et al., 2008).

Биоразлагаемые полимеры и их модификация в наноразмерных масштабах являются перспективными для контролируемой доставки лекарств в совре-

менной терапии благодаря их большой биодоступности, биосовместимости, контролируемому высвобождению и меньшей токсичности (Grobmyer et al., 2010; Pool et al., 2012; Salvia-Trujillo et al., 2013). Базовая модель полимерной системы доставки лекарств показана на рисунке 2. Молекулы лекарственного средства заключены в полимерные наночастицы, которые транспортируют их к участку клетки, где они начинают разрушаться из-за воздействия специфичной среды, высвобождая лекарственное средство. Существует целый ряд полимерных наночастиц, таких как хитозан, полимолочная кислота, поли-алкилцианоакрилаты, поликапролактон и т. д., которые используются для наноинкапсулирования различных лекарственных средств (Kumari et al., 2010).

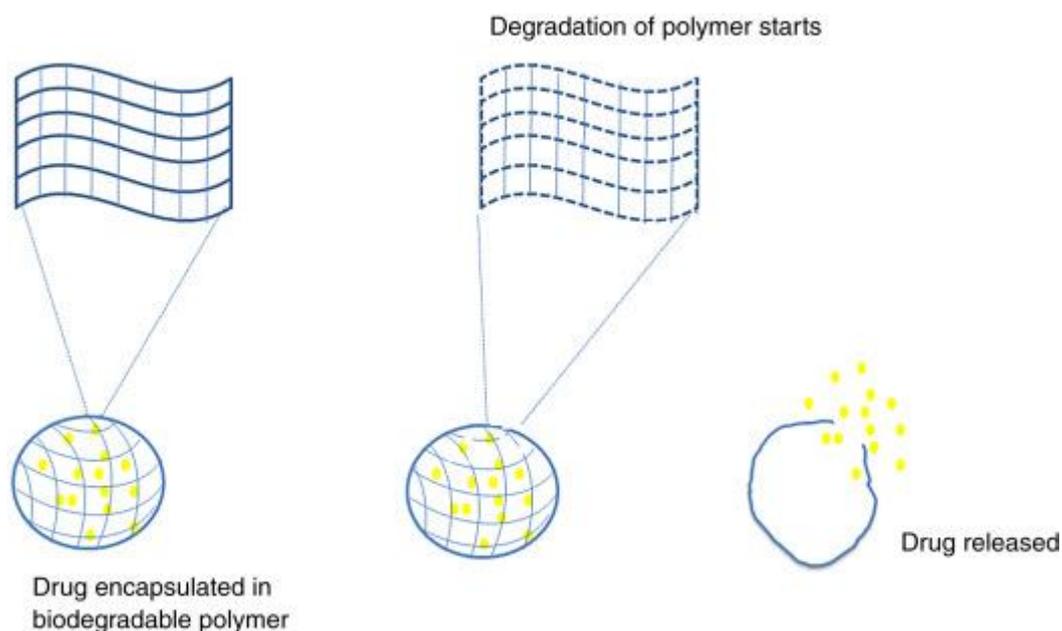


Рисунок 2 – Система доставки полимерных лекарств (Kumari et al., 2010)

Все чаще с целью стабилизации и функционализации наночастиц для биомедицинского использования в качестве оболочки применяются различные типы материалов. Полимерная оболочка делает наночастицы биосовместимыми, предотвращает их агрегацию и выполняет функцию резервуара лекарственного средства (McVain et al., 2008). Так, например, суперпарамагнитные наночастицы оксида железа могут быть функционализированы или модифицированы покрытиями из гидрофильных, биосовместимых и биоразлагаемых по-

лимеров, таких как хитозан (Andrade et al., 2011; Fonte et al., 2012; Grenha, 2012).

Хитозан является природным, линейным, щелочным, гидрофильным, биоразлагаемым, биосовместимым, нетоксичным полимером (Andrade et al., 2011; Kumar, 2000) (рисунок 3), одним из самых распространенных полимеров в природе. Он получается путем *N*-деацетилирования хитина, который является структурным элементом в раковинах ракообразных (крабов, креветок, омаров и т. д.) и в клеточных стенках грибов (Andrade et al., 2011; Kumar, 2000). Удаление ацетатного фрагмента из хитина показано на рисунке 3.

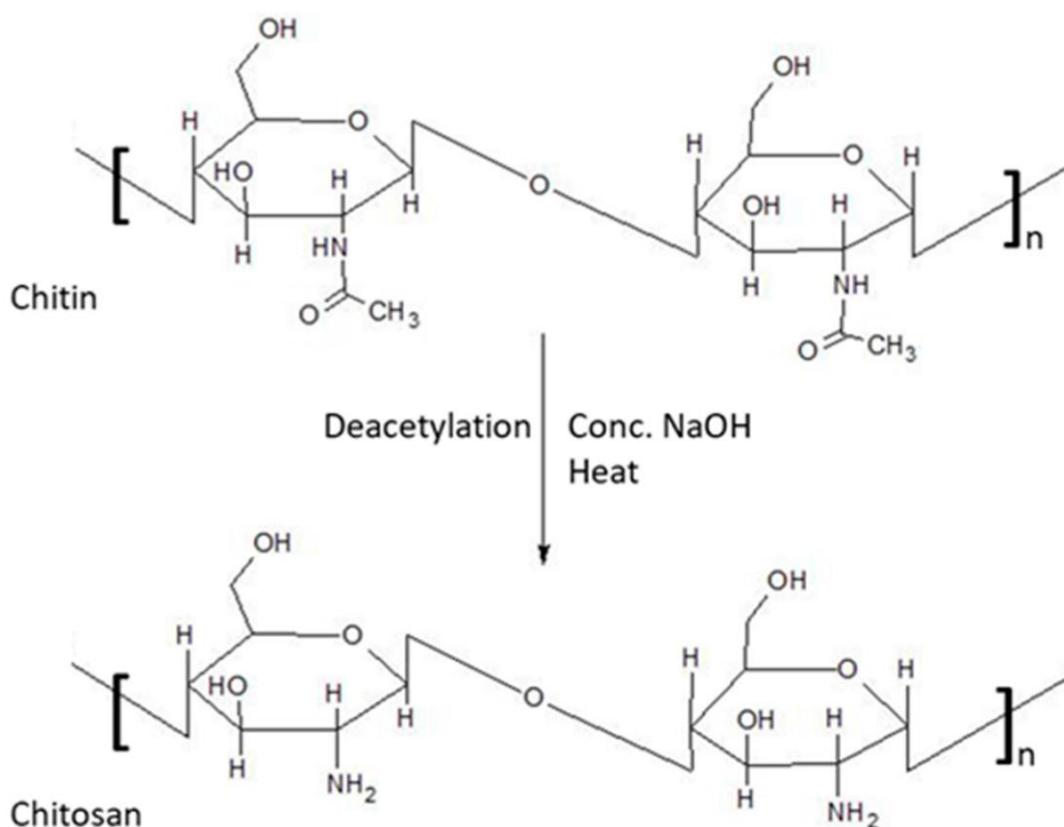


Рисунок 3 – Молекулярная формула хитозана (Munawar A. Mohammed, 2017)

Хитозан включает большое количество полимеров, которые различаются по степени *N*-деацетилирования (40–98 %) и по своей молекулярной массе (Hejazi and Amiji, 2003). Эти две характеристики очень важны для физико-химических свойств хитозана и могут оказывать существенное влияние на его биологические свойства (Sannan et al., 1976). Соли хитозана растворимы в воде; растворимость зависит от степени деацетилирования и pH раствора. Хитозан

растворим в кислых растворах благодаря протонированию аминогрупп в полимерной цепи, сильно деацетилованный хитозан (85 %) легко растворим в растворах с рН до 6,5, но по мере снижения степени деацетилирования солубилизация становится более сложной (Cho et al., 2000; Rinaudo, 2008; Singh and Ray, 2014). Аминные группы протонируются при кислотном рН, что делает хитозан водорастворимым катионным полиэлектролитом. Полное протонирование происходит при значениях рН ниже 3,4 (Kumar et al., 2004; Tsai et al., 2010). Напротив, при высоких значениях рН выше 6,5 амины хитозана депротонируются, и полимер теряет свой заряд и становится нерастворимым. Хитозан может подвергаться сополимерным ассоциациям, которые могут приводить к образованию волокон и сетей (пленок и гелей) при высоких значениях рН (Kumar et al.; 2004, Yi et al., 2005). Было показано, что в опухолевых клетках значения рН низкие (рН 5,5) из-за высокого анаэробного метаболизма глюкозы, кроме того, в кислых, внутриклеточных органеллах раковых клеток, таких как эндосомы и лизосомы наблюдаются значения рН, равные 3,0–5,5 (Lim et al., 2011). После эндоцитоза скорость высвобождения лекарственного средства может быть быстро увеличена при низком рН опухолевых клеток благодаря рН-чувствительным наночастицам хитозана. Предполагается, что они демонстрируют эффективную схему высвобождения лекарственного средства в микроокружении опухоли (Aydin and Pulat, 2012). Кроме того, хитозан обладает внутренней противоопухолевой активностью. Он усиливает выработку фактора некроза опухоли- α (TNF- α) моноцитами, тем самым способствуя синтезу оксида азота макрофагами и стимулируя нейтрофилы (Dodane and Vilivalam, 1998). Для осуществления химиотерапии онкопатологии была разработана рН-чувствительная наносистема конъюгата – полимер-лекарственное средство, в котором наночастицы изменяют свой поверхностный заряд вблизи опухолевой клетки (рН 6,8) с отрицательного на положительный, чтобы облегчить клеточное поглощение. В клеточном компартменте за счет повышения кислотности (рН 5) происходит высвобождение лекарственного средства (Cheng et al., 2007; Du et al., 2011).

Изобилие реакционноспособных гидроксильных и аминных функциональных групп в молекулярной структуре хитозана выгодно для обеспечения мест прикрепления и дальнейшего конъюгирования функциональных молекул. Протонированные аминогруппы хитозана также обеспечивают чистый катионный характер, облегчая электростатическое комплексообразование с анионными лигандами и лекарственными средствами. Все эти свойства хитозана делают его доступным для дальнейших модификаций и желательным для широкого спектра биомедицинских применений (Andrade et al., 2011; Fonte et al., 2012; Grenha, 2012).

Исследователи еще обсуждают точный механизм (Goy et al., 2009; Kong et al., 2010; Rabea et al., 2003; Yadav and Bhise, 2004), но известно, что хитозан обладает мощной внутренней антибактериальной, противогрибковой (Gadelha de Carvalho et al., 2011; Goy et al., 2009; Pasquantonio et al., 2008; Peña et al., 2013) и противовирусной активностью (Rabea et al., 2003). Хитозан широко применяется в различных областях, включая упаковку пищевых продуктов, антиоксиданты, гидрогели, мембраны, очистку воды, клеи, биосенсоры, тканевую инженерию и доставку лекарств (Kong et al., 2010; Elsabee et al., 2009; Honarkar and Barikani, 2009). Хитозан также используется для улучшения наночастиц для доставки лекарств и генов (Park et al., 2007). Легкость конъюгации хитозана с анионными терапевтическими средствами и молекулами лигандов позволила разработать многие перспективные составы носителей, нацеливаясь на клетки и улучшая клеточное проникновение терапевтических средств (De la Fuente et al., 2008; Park et al., 2007). Анионный характер хитозана облегчает загрузку нуклеиновых кислот, обеспечивая защиту от деградации нуклеазы и легкого проникновения через клеточные мембраны при доставке генов и терапии (Liu and De Yao, 2002; Van der Lubben et al., 2001). Эти наноносители могут обойти все ограничения обычной доставки вирусных генов благодаря их биосовместимости и отсутствию иммуногенности (Mao et al., 2010). Хитозан также может быть использован при доставке генетических вакцин. В тканевой инженерии хитозан используется в качестве материала для регенерации тканей, способствуя адге-

зии и росту клеток благодаря его биоадгезивным свойствам (Custódio et al., 2010; Isikli et al., 2012; Zan et al., 2008). Одно из наиболее важных свойств хитозана в доставке лекарств зависит от его способности временно открывать плотные эпителиальные соединения, что приводит к усилению проникновения макромолекул через хорошо организованный эпителий, например назальный (Fernandez-Urrusuno et al., 1999; Vila et al., 2004), кишечный (Artursson et al., 1994; Borchard et al., 1996; Prego et al., 2005), окулярный (De Campos et al., 2001), буккальный (Portero et al., 2007) и легочный (Al-Qadi et al., 2012). Хитозан также имеет высокую степень задержки в кровообращении, что позволяет предположить, что он может быть эффективным носителем для лекарств, которые быстро выводятся из организма (Dodane and Vilivalam, 1998). В связи с тем, что слизистая оболочка желудка обладает отрицательным зарядом из-за содержания сиаловой кислоты, карбоксильных или сульфатных групп, в гликопротеине слизи обеспечивается адгезивность посредством электростатических взаимодействий, образования Н-связей, сил Ван-дер-Ваальса и других слабых связей (Lehr et al., 1993). Было продемонстрировано, что данное свойство мукоадгезии обеспечивает эффективное лечение инфекций в районах тела, содержащих слои слизи, таких как внешний глазной компартмент (Ali and Lehmussaari, 2006; Ludwig, 2005), слизистая оболочка желудка, влагалища (Acarturk, 2009; Das Neves and Bahia, 2006; Dobaria et al., 2008; Hussain and Ahsan, 2005; Valenta, 2005). Нагруженные амоксициллином хитозановые мукоадгезивные микросферы показали лучшую эффективность, чем чистый препарат, для эрадикации от *H. Pylori* (Patel, 2015).

Огромный рост нанотехнологий проложил путь к развитию передовых систем доставки лекарств, обладающих сверхточностью и контролем над выпуском действующего вещества. Для обеспечения адресной и контролируемой доставки лекарств приняты разные стратегии, такие как инкапсуляция, биомаркеры и искусственные наноносители. Эти наноносители могут состоять из биологических материалов или химически синтезированных материалов или их комбинации. Основной проблемой для любой системы доставки лекарств явля-

ется биосовместимость и переносимость, потому что взаимодействие синтетических материалов с клетками организма животных полностью отличается от биологического (Rizzello et al., 2013).

Таким образом, посредством нанотехнологий улучшается доставка лекарственных веществ; транспортировка лекарств через биологические барьеры, такие как плотные эпителиальные и эндотелиальные барьеры; целенаправленная доставка лекарств с предельной точностью и контроль над высвобождением действующих веществ; возможна комбинированная терапия, методы визуализации могут быть улучшены с помощью наномаркеров, которые также помогут визуализировать место доставки лекарств путем модуляции наноносителей. Биосовместимость и биодоступность являются основными характеристиками идеального наноносителя, позволяющими повысить терапевтический эффект лекарственных средств при минимизации токсического воздействия, пиковой нагрузки на организм.

1.2. Токсикологические свойства систем доставки лекарственных веществ на основе микро- и наночастиц

С развитием нанотехнологий свое развитие как субдисциплина получила нанотоксикология. Это связано с тем, что наночастицы могут изменить свои физико-химические свойства с точки зрения увеличения химической реактивности (Xu and Sun, 2013). Результаты исследований указывают на то, что клетки могут поглощать и депонировать наночастицы в соответствии с активными или пассивными механизмами. Идентичные частицы, различающиеся размерными характеристиками, зарядом и покрытиями, отличаются по фармакологическим свойствам. На сегодняшний день не существует простых подходов, позволяющих точно определить сложное поведение потенциально опасных наночастиц. Стандартные токсикологические анализы и протоколы не применяются к наночастицам, и их классификация более сложна, поскольку доза не единственный параметр, который следует принимать во внимание (Juillerat-Jeanneret et al., 2015). В отличие от классической токсикологии, где доза почти всегда связана с массой, метрика логической дозы наночастиц (Lee et al., 2014) связана с количеством частиц, попадающих в каждую клетку. Для определения количества наночастиц представляет интерес использование дискриминационной метрики, при которой вычисляется общая поверхность наночастиц, где происходят многие представляющие интерес химические реакции. Хотя масса сама по себе не может предсказать площадь поверхности, число наночастиц в пределах определенного размера и диапазона формы является предиктором площади поверхности и, следовательно, скорее всего, будет метрикой дозы, которая является более прогнозирующей величиной вреда, чем простая масса (Chen et al., 2012).

Благодаря небольшому размеру наночастицы легко проникают в организм, несмотря на его естественные барьеры, где, согласно исследованиям, они агломерируют. В научном сообществе широко распространено мнение, что наночастицы диаметром менее 10 нм ведут себя подобно газу, поэтому они могут легко встраиваться в ткани, модифицировать клеточную среду или разрушать клеточную мембрану (Albanese et al., 2012; Chuang et al., 2015).

1.2.1. Металлические наночастицы

На сегодняшний день успешно синтезированы различные металлы и комплексы металлов, такие как наночастицы золота, наночастицы серебра, наночастицы оксида железа, наностержни золота, квантовые точки (КТ). Чтобы понять их токсичность и биологическую приемлемость, нам необходимо знать их поглощение, выведение, накопление и фармакокинетику (Lasagna-Reeves et al., 2010; Li and Chen, 2011; Meyer et al., 2010). Тщательный анализ опубликованных данных показывает, что цитотоксичность меньше у химически стабильных наночастиц, а при окислении, восстановлении и растворении наночастицы становятся цитотоксичными и генотоксичными для клеточных организмов (Auffan et al., 2009). Чтобы понять побочные эффекты (Griffitt et al., 2008), изучали различные металлические наночастицы серебра, никеля, алюминия, кобальта и диоксида титана для их воздействия на рыбок данио и различные виды водорослей. Их результаты показали, что для всех организмов наночастицы серебра и меди токсичны, а диоксид титана нет. Систематическое исследование наночастиц TiO_2 показывает, что при воздействии на ткани и клетки легких он вызывает воспалительный ответ (Lai et al., 2008; Park et al., 2007).

Оксид алюминия. По данным «Глобального рынка наночастиц оксида алюминия», наночастицы на основе алюминия обеспечивают 20 % всех наноразмерных химических веществ. Исследования их токсикологии дали неоднозначные результаты. Наночастицы оксида алюминия изменяют жизнеспособность клеток, функцию митохондрий и влияют на экспрессию белков гематоэнцефалического барьера, а также усиливают окислительный стресс. Радзюн с соавт. (2011) показали, что наночастицы оксида алюминия в концентрациях от 10 до 400 мкг/мл не оказывают существенного токсического влияния на жизнеспособность клеток млекопитающих. В другом исследовании сообщалось о дозозависимой (25–40 мкг/мл) цитотоксичности как действию оксида алюминия (160 нм) на мезенхимальные стволовые клетки. Peng с соавт. сообщили, что наночастицы оксида алюминия (30–40 нм) обладают дозозависимыми генотоксическими свойствами; они оценивали генотоксичность с помощью микроядерно-

го теста с использованием клеток крови крысы. Другое исследование, в котором изучалась линия клеток лимфомы мыши, показало, что наночастицы оксида алюминия (<50 нм) вызывают генотоксические эффекты в виде повреждения ДНК, но без каких-либо мутагенных эффектов (Peng et al., 2015).

Золото. Наночастицы золота обладают уникальными физико-химическими свойствами. Они обладают способностью легко связываться с аминокеттогруппами и тиоловыми группами. Наночастицы золота считаются достаточно безопасными, поскольку их ядро инертно и нетоксично. Наночастицы золота разного размера (4/12/18 нм) с различными покрытиями были исследованы на цитотоксическую активность против линии клеток лейкемии, и результаты этого исследования утверждают, что сферические наночастицы могут разрушать клеточные барьеры и являются нетоксичными для внутриклеточной среды; их цитотоксичность оценивали с помощью анализа МТТ (Li et al., 2014). Цитотоксичность наночастиц золота варьируется от клеточной линии к клеточной линии и тесно связана с их физико-химическими свойствами. Изменение токсичности в зависимости от различных клеточных линий было тщательно исследовано для клеточных линий рака легких и печени человека (Leung et al., 2012).

Оксид меди. Наночастицы оксида меди в основном используются в теплоносителях, антимикробных реагентах, полупроводниках и внутриматочных контрацептивных устройствах. Исследования показали, что наноматериалы на основе меди обладают гепато- и нефротоксичностью. В одном исследовании *in vitro* были проанализированы наночастицы оксида меди размером 50 нм, результаты показали, что они являются гено- и цитотоксическими, вызывая реакции окислительного стресса и нарушая целостность клеточной мембраны (Li et al., 2014).

Серебро. Наночастицы серебра используются в виде протезов и раневых повязок, встроенных антимикробных агентов и для покрытий хирургических инструментов. Они проникают в организм человека различными путями и накапливаются в различных тканях, пересекая гематоэнцефалический барьер

(ГЭБ). В исследованиях *in vivo* после воздействия на организм путем ингаляции или подкожной инъекции наночастицы серебра наблюдались в различных органах (печени, почках, легких, селезенке, головном мозге) (Al Gurabi et al., 2015). По сравнению с другими наночастицами наночастицы серебра показали большую токсичность с точки зрения жизнеспособности клеток, утечки лактатдегидрогеназы и образования активных форм кислорода (АФК). Ebabe Elle et al. сообщили о дозозависимой цитотоксичности и образовании клеточных ДНК-аддуктов после воздействия наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном (6–20 нм), на клеточную линию рака легких человека (Ebabe Elle et al., 2013).

Оксид цинка. Наночастицы, полученные из оксида цинка, имеют множество применений и используются в качестве УФ-детекторов, газовых датчиков и добавок в красках, солнцезащитных кремах, волновых фильтрах и средствах личной гигиены. Наночастицы оксида цинка изучались на предмет любых возможных токсических эффектов, которые они могут проявлять в отношении бактерий и клеток млекопитающих. Цитотоксичность, индукция АФК и разрушение клеточной мембраны были зарегистрированы в экспериментах на клеточных линиях млекопитающих как наиболее значимые побочные эффекты наночастиц цинка (Guan et al., 2012). Brunner et al. сообщили, что после воздействия на клетки мезотелиомы человека и фибробластов грызунов наночастицами оксида цинка с высокой концентрацией (49 мг/мл) жизнеспособность клеток отсутствовала. Мейер с соавт. сообщили об уменьшении жизнеспособности клеток после воздействия на вышеуказанные клеточные линии наночастиц оксида цинка 20 нм (Wilhelmi et al., 2013). Как в исследованиях *in vitro*, так и *in vivo* сообщалось о различной степени цитотоксичности и генотоксичности, проявляемой наночастицами оксида цинка. Hackenberg с соавт. показали, что наночастицы оксида цинка проявляют свою генотоксичность через повреждение ДНК клеточной линии Нер-2. Хроническое воздействие наночастиц оксида цинка (300 мг/кг) приводит к окислительному повреждению ДНК и изменению ферментов печени (Hackenberg et al., 2013).

Оксид железа. Наночастицы оксида железа используются в областях диагностики, биомедицины и доставки лекарств. Исследования *in vivo* показали, что после проникновения в клетки наночастицы оксида железа остаются в клеточных органеллах (эндосомах/лизосомах, особенно в гепатоцитах), способствуют клеточному опылению железа и высвобождаются в цитоплазму после разложения. Наблюдалось, что магнитные наночастицы оксида железа после ингаляции накапливаются в печени, селезенке, легких и мозге, показывая свою способность проникать через ГЭБ (Formenti et al., 2014). Наночастицы обладают токсическим действием в виде клеточных лизисов, воспалений, нарушения системы свертывания крови и снижения жизнеспособности клеток. Результаты переменной жизнеспособности клеток были получены при контакте с наночастицами оксида железа, покрытыми различными веществами. Макрофаги мышей были чувствительны к наночастицам оксида железа, покрытым Твином, 30 нм (Guo and Barnard, 2013), макрофаги человека снижали жизнеспособность на 20 % после семи дней инкубации с наночастицами оксида железа, покрытыми декстраном. Кроме того, в другом исследовании на клеточной линии Neuro-2A мыши было обнаружено, что наночастицы оксида железа размером 25 нм проявляют меньшую токсичность с точки зрения изменения морфологии клеток, определяя клеточный апоптоз, изменение проницаемости клеток и митохондриальных функций (Reynolds et al., 2014). После 48-часового воздействия наночастиц оксида железа, покрытых полимером, на мезенхимальные стволовые клетки крысы установлена 70 % жизнеспособность клеток. Считается, что токсические эффекты наночастиц оксида железа связаны с чрезмерным образованием АФК. Эти генерированные АФК в дальнейшем могут вызывать перекисное окисление липидов и повреждение ДНК (Yang et al., 2014).

Оксид титана. Оксид титана является инертным соединением, но исследования показали, что наночастицы диоксида титана обладают некоторыми токсическими эффектами у экспериментальных животных, включая повреждение ДНК, генотоксичность и воспаление легких (Peira et al., 2014). Диоксид титана может вызывать окислительный стресс и определять аддукты ДНК. Поми-

мо генотоксичности, нанометрические и субмикронные частицы диоксида титана (5–200 нм) оказывают токсическое воздействие на гомеостаз иммунной системы, почек, селезенки, миокарда и липидов у экспериментальных животных (Jaeger et al., 2012).

КТ – это неорганический материал, который может быть изготовлен в различных составах, например ZnO, CdS, CdSe, CdTe, ZnS. Каждый тип КТ имеет свои различные свойства в зависимости от неорганических предшественников, метода синтеза, формы, размера (Moreels et al., 2009; Shiohara et al., 2004). Таким образом, их соответствующие риски для здоровья различны (Lovrić et al., 2005), что делает токсикологическое исследование КТ очень сложным. КТ используются в инкапсулированной форме для визуализации, а также для доставки лекарств (Bruchez et al., 2007; Rosenthal et al., 2011), что делает их биосовместимыми, но, если они подвергаются воздействию клеток организма, то могут вызывать значительный токсический эффект из-за своей неорганической природы (Ryman-Rasmussen et al., 2007).

1.2.2. Наночастицы неметаллических веществ

Углеродные наноматериалы. Одними из наиболее исследованных наноматериалов являются углеродные материалы, такие как нанотрубки, фуллерены, как однослойные, так и многослойные углеродные нанотрубки. Магрез с соавт. утверждают, что углеродные наноматериалы обладают зависящей от размера цитотоксичностью. Они протестировали различные формы углеродных наночастиц на клетках рака легких, чтобы оценить жизнеспособность клеток. В последнее время в литературе все чаще возникают гипотезы об асбестоподобном воздействии на живые клетки углеродных нанотрубок, поскольку их размер меньше волокна асбеста (Patil et al., 2015). После инъекции многослойных углеродных нанотрубок Poland et al. обнаружили, что они вызывают канцерогенное действие, подобное асбесту. Одностенные углеродные нанотрубки имеют тенденцию накапливаться в печени и приводить к дисбалансу биохимических процессов с участием глутатиона, лактатдегидрогеназы, аспартаттран-

саминазы, аланина трансаминазы и малонового диальдегида у лабораторных животных (Khan et al., 2013a; Khan et al., 2013b). Многолетние исследования *in vitro* на клетках, эпидермоидоподобной карциномы человека, клетках яичника китайского хомяка и клетках эмбриональной почки человека (HEK293) привели к выводу, что фуллерены могут проявлять генотоксическое поведение в отношении повреждения хромосом, разрушения цепей ДНК и образования микроядер после 1 нг/мл (Khan et al., 2013a; Khan et al., 2013b).

Оксид кремния. Использование наночастиц кремнезема может быть выгодным подходом для эффективных систем доставки лекарств. Наночастицы диоксида кремния могут быть функционализированы с целью переноса лекарственного средства. Несмотря на то, что изначально считалось, что нанокремнезем проявляет превосходные биосовместимые свойства, в недавних исследованиях указывается на корреляцию между указанными наночастицами и выработкой АФК и повышенным окислительным стрессом (Vivero-Escoto and Vega, 2014). Fan et al. (2014) описано повышение уровня АФК, ЛДГ и малонового диальдегида в клетках бронхоальвеолярной карциномы человека, инкубированных с наночастицами диоксида кремния (15–46 нм) в различных дозировках. Также были описаны повышенные воспалительные биомаркеры, связанные с наночастицами кремнезема, такие как IL-1, IL-6, IL-8, фактор некроза опухоли TNF- α и митохондриальные нарушения (Fan et al., 2014, Yang et al., 2015a, Yang et al., 2015b).

1.2.3. Наночастицы полимерных материалов

Биоразлагаемые наночастицы полимерной природы потенциально полезны для инкапсуляции биоактивных веществ для адресной доставки лекарств с исключительными перспективами для химиотерапевтических агентов. Встраивание различных других молекул (пептидов, белков, нуклеиновых кислот) может улучшить устойчивость высвобождения. Для повышения их специфичности обычно используются подходы к функционализации или покрытию (Xue et al., 2013). В связи с тем, что полимерные наночастицы не обладают токсичны-

ми, воспалительными и иммунологическими свойствами, они могут быть альтернативой менее удобным материалам. Наносистемы поли (D, L-лактид-согликолид) успешно используются для направленного высвобождения лекарств и других молекул. На сегодняшний день наносистемы на полимерной основе описываются как наименее токсичные, поскольку гидролиз полимера происходит с образованием биосовместимых метаболитов: молочной и гликолевой кислот. Несмотря на их замечательные свойства, некоторые утверждают, что поверхностные покрытия могут быть источником токсичности полимерных наночастиц, проявляющейся в отношении макрофагов (Josefsen and Boyle, 2012).

Липосомы. В этих системах в основном используются натуральные липиды, которые обладают высокой биосовместимостью, поэтому организм не может идентифицировать их как инородные материалы, но при использовании синтетических полимерных наночастиц скорость их выведения из организма варьируется от материала к материалу, что приводит к их накоплению во внутренних органах и мононуклеарной фагоцитарной системе (Gong et al., 2012; Murthy, 2007; Zentner et al., 2001). Удаление синтетических полимерных наночастиц происходит очень медленно, что способствует их накоплению в организме (Caliceti and Veronese, 2003). Чтобы преодолеть эту проблему, необходимо понять влияние их размера, формы, заряда, а также морфологии и функциональности поверхности (Geng et al., 2007). Эти факторы влияют на время пребывания крови и накопление этих наноматериалов в организме. Опираясь на необходимые свойства, возможно контролировать клиренс крови и биораспределение липосом, обеспечивая им специфическое поглощение и накопление в тканях (Alexis et al., 2008).

Хитозан. Хитозан известен как нетоксичный полимер и одобрен FDA (Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов, США) для тканевой инженерии, доставки лекарств, наружного применения как компонент раневых покрытий (Wedmore I. et al., 2006), перевязочных материалов (Hemcon®), материалов, восстанавливающих хрящи суставов (BST-CarGel®) (Casettari L. et al., 2014), и др. Безопасным является перо-

ральное применение хитозана: он широко используется при производстве биологически активных добавок (Tiens Group Co. Ltd, «Эвалар», «Биопрогресс»). Тем не менее парентеральное использование хитозана и его производных является дискуссионным вопросом. В настоящее время активно ведутся работы, касающиеся гемосовместимости этого полимера и его различных модификаций (Balan V. et al., 2014). Известно, что введение отрицательно заряженных групп в молекулу хитозана, а также формирование субмикронных носителей на его основе может существенно улучшить гемосовместимость (Svirshchevskaya E. V. et al., 2016). В работе Richardson S. C. W. et al. (1999) хитозаны с различными характеристиками (молекулярной массы (ММ) 10 кДа и степени деацетилирования (СД) 55,3 %) оказывали незначительную цитотоксичность относительно клеточных линий CCRFCЕМ (лимфобластный лейкоз человека) и L132 (эмбриональные клетки легких человека), минимальная полуингибирующая концентрация (МПК) составила >1 мг/мл. В своих работах Schipper и др. описывали действие хитозана с различными ММ и СД на клетки Caco-2, HT29-N и *in situ* у крыс с раком тонкой кишки. Авторы выяснили, что при высокой СД токсичность связана с ММ и концентрацией, при снижении СД токсичность была менее выражена и не зависела от ММ (Schipper N. G. et al., 1996). Хитозаны с разными характеристиками в целом не токсичны, возможно в силу их нерастворимости в условиях эксперимента при нейтральном значении pH. Химическая модификация полимера, направленная на увеличение растворимости или придание молекуле гидрофобных свойств, может влиять на токсичность. Из результатов, представленных в работах Carreño-Gómez V. et al. (1997) и Opanasopit P. et al. (2007), следует, что МПК у хитозана варьирует от 0,21 до 2,5 мг/мл. Однако модифицированный хитозан может иметь большие значения МПК (от 0,8 мг/мл для триметил хитозана ММ 100 кДа, 36 % степень замещения до 200 мг/мл для N-октил-осульфат хитозана ММ 65 кДа). Авторы Kean T. и др. показали, что N,N,N-триметил хитозан с ММ 3-6 кДа, степенью кватернизации менее 55 % имел МПК >10 мг/мл, однако при увеличении степени триметилирования увеличивалась и цитотоксичность (Kean T. et al., 2005). Сукцинильные

производные хитозана, а также наночастицы на их основе практически не влияли на пролиферацию клеток фибробластов и лимфобластов человека K562 (Aiping Z. et al., 2006). Частицы, полученные из хитозана с ММ 100–150 кДа, СД 20 %, О-карбоксиметил хитозана, N,O-карбоксиметил хитозана, также оказались не токсичны в тесте МТТ с использованием клеток линии MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека) (Anitha A. et al., 2009).

Экзосомы. При изучении острой и хронической токсичности Zhu et al. (2017) установили, что многократное введение экзосомальных частиц в организм мышей не вызывает визуальных признаков токсичности, статистических различий в массе тела, изменений общего анализа и биохимии крови, а также гистопатологических изменений тканей (тимус, сердце, легкие, печень, селезенка, почки, надпочечники, яичники, матка, мозг), что указывает на отсутствие токсичности экзосом. Отсутствие токсических свойств и хорошую биосовместимость экзосомальных частиц связывают с их биологическим происхождением (Zhu et al., 2017).

Клеточные процессы имеют преимущественно биохимическую природу, и многие из них основаны на химических связях, которые придают определенный вид и определенную функцию большой цепной структуре белков. В зависимости от химической конформации, структуры, размера и архитектуры, можно говорить о полезных и вредных эффектах терапевтических наноматериалов, таким образом появляется понятие степени токсичности. Системы на основе наночастиц считаются эффективным подходом для лечения тяжелых заболеваний, таких как рак, трудно поддающихся лечению инфекций или для удаления тромбов из кровотока. Преимущество наночастиц заключается в том, что они связывают на своей поверхности большое количество активного вещества, поскольку имеют большую площадь поверхности, что позволяет прикреплять и доставлять фармакологическое соединение в целевой участок, которое также может высвобождаться контролируемым образом. С точки зрения токсичности этих новых образований в области биоматериалов мнения разделились между исследователями, потому что в зависимости от агентов функционализации, от

пути синтеза и свойств представленные данные варьируются. Степень токсичности проявляется в отношении здоровых живых тканей из-за концентрации наночастиц. Кроме того, они могут быть небезопасными, поскольку распространяются по организму, вызывая системные эффекты и вторгаясь в основные органы. Тем не менее наночастицы будут играть важную роль в биомедицине будущего и использоваться с максимальной эффективностью (Xu and Sun, 2013; Juillerat-Jeanneret et al., 2015; Chen et al., 2012; Albanese et al., 2012).

Проведенный анализ источников литературы, отражающих результаты оценки токсикологических параметров нанопрепаратов, свидетельствует о том, что их токсичность существенно зависит от размера наночастиц. Однако при оптимальном размере интенсивность токсических эффектов как носителей, так и действующих веществ существенно снижается, повышается биодоступность, что имеет особое значение при терапии заболеваний со сложной локализацией. Исходя из этого считаем, что оптимальными носителями лекарственного вещества в наших исследованиях являются экзосомальные и хитозановые частицы.

1.3. Применение экзосомальных и хитозановых частиц при конструировании фармацевтических композиций

На сегодняшний день экзосомы находятся в центре внимания как перспективные носители лекарственных средств (Ciesla M. et al., 2011; Malladi S., et al., 2016). Такие качества, как наноразмерность, отсутствие токсичности, биосовместимость и селективность, обуславливают перспективность применения экзосом в качестве системы доставки лекарственных веществ. Экзосомы и экзосомальные конъюгаты применяются при разработке иммунотерапевтических средств, вакцин и модуляторов ангиогенеза, изучается возможность использования экзосом в комбинации с химиотерапией и таргетной иммунотерапией (Тихонова М. В. с соавт., 2017).

Структура экзосом представляет собой бислойную липидную мембрану, несущую в себе множество адгезивных белков, обеспечивающих взаимодействие с клетками. Экзосомы осуществляют межклеточные коммуникации, так как обладают селективностью и могут обеспечить эффективную доставку различных терапевтических агентов к клеткам-мишеням. В связи с тем, что экзосомы являются продуктом клеток, возможна их модификация через родительские клетки путем экспрессии функциональных групп на их поверхности или добавления желаемой биологической активности. При необходимости избежать захвата мононуклеарными фагоцитами возможно применение экзосом, секретруемых моноцитами и макрофагами донора-реципиента. В целом экзосомы объединяют преимущества синтетических наноносителей и клеточно-опосредованных систем доставки, избегая при этом их ограничений.

Существует терапевтическая методика, при которой лейкоциты, взятые из периферической крови путем афереза, размножаются и культивируются, а затем экзосомы загружают терапевтическим агентом и вводят обратно пациенту. Одной из основных проблем является возможность масштабирования производства. Действительно, от количества экзосом, выделяемых одной клеткой, зависит конечная стоимость производства, а также клиническое применение. В этом отношении выбор родительских клеток имеет решающее значение.

Например, известно, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) продуцируют большое количество экзосом, предполагается, что эти клетки могут быть эффективными для производства экзосом в клинически применимых масштабах (Yeo R. W. et al., 2012). Модификация режимных параметров культивирования донорских клеток или применение биореакторов может значительно увеличить экзосомальное производство. Например, культивирование дендритных клеток в течение длительного периода времени (Lamparski H. G. et al., 2002) или при низком pH (Ban J. J. et al., 2015) увеличивает продукцию экзосом в 5–10 раз. Примечательно, что экзосомы могут быть сконцентрированы, лиофилизированы и восстановлены в водных растворах (Haney M. J. et al., 2015).

Фактически экзосомы уже были одобрены для клинических испытаний на человеке (Mignot G. et al., 2006). В частности, экзосомы были очищены из моноцитарных культур от 15 пациентов с метастатическим течением меланомы. Хорошие производственные процедуры (GMP) позволяют собрать в пять раз больше экзосомных носителей МНС класса II. Затем экзосомы были загружены меланомным антигеном *in vitro* и вводились аутологичным способом, чтобы способствовать развитию антимеланомного иммунитета с помощью терапевтической вакцинации. Результаты проведенных исследований подтверждают, что пациенты хорошо переносят повторные введения аутологичных экзосом в течение 21 месяца (Escudier B. et al., 2005). В аналогичном испытании пациентам с клеточной карциномой легкого вводили аутологичные экзосомы еженедельно в течение четырех недель, при этом наблюдались аналогичные низкие уровни иммунных ответов (Morse M. A. et al., 2005). В другом испытании для лечения немелкоклеточного рака легких (NSCLC) пациентам вводили экзосомы, полученные из дендритных клеток, несущие IL-15Ra и NKG2D, в комбинации с циклофосфамидом после химиотерапии на основе платины. Асцитэкзосомы в сочетании с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) были использованы в иммунотерапии колоректального рака (Dai S. et al., 2008). Терапия на основе экзосом безопасна и эффективна в индукции

антиген-специфического ответа Т-лимфоцитов, однако остается ряд технических препятствий, которые должны быть преодолены (Kim M. S., 2016).

Для терапии болезни Паркинсона была разработана экзосомальная система доставки антиоксидантного фермента каталазы (ЕхoСАТ), являющейся мощным антиоксидантом, который противодействует разрушающему нейроны воспалению, вызывающему болезни Паркинсона и другие дегенеративные неврологические расстройства. Е. В. Батракова и ее коллеги из Центра нанотехнологий при Фармацевтической школе им. Эшельмана при ООН, а также сотрудники лаборатории «Химический дизайн бионаноматериалов» Е. Д. Плотникова и Н. Л. Клячко извлекли экзосомы из лейкоцитов и успешно загрузили их ферментом каталазой. Данное исследование было поддержано грантами Национального института здравоохранения США и грантами Министерства образования и науки Российской Федерации. Впервые такой большой терапевтический белок, как каталаза, доставляется в мозг с использованием экзосом. Попадание лекарств в мозг затруднительно, так как он защищен и изолирован чрезвычайно избирательным гематоэнцефалическим барьером. Значительное количество экзосом было обнаружено в мозге экспериментальных животных после интраназального введения наноформуляций. На моделях болезни Паркинсона *in vitro* и *in vivo* установлено, что ЕхoСАТ легко захватывается клетками нейронов, обеспечивает значительное нейропротекторное действие. Установлено, что экзосомальные системы на основе каталазы обладают хорошим потенциалом для разработки универсальной стратегии лечения воспалительных и нейродегенеративных расстройств (Haney M. J. et al., 2015; Зайцева Е. А. с соавт., 2016).

Под руководством Е. В. Батраковой также получен экзосомальный препарат «Паклитаксела». Извлеченные из лейкоцитов мыши экзосомы, загруженные паклитакселом (ЕхoРХТ), протестировали при лечении раковых клеток с множественной лекарственной устойчивостью в чашках Петри. Установлено, что доза, необходимая для уничтожения рака, при применении ЕхoРХТ в 50 раз

меньше, чем при применении используемого в настоящее время препарата «Таксол» (Batrakova E. V. et al., 2015).

Хитозан привлек внимание в фармацевтической индустрии благодаря своей безопасности, биосовместимости, биodeградируемости и мукоадгезивности. Проведенный анализ антимикробной активности хитозана показал широкий диапазон антимикробного действия (Рашидова С. Ш. и соавт., 2009). Вышеперечисленные свойства обуславливают применение в различных областях, включая упаковку пищевых продуктов, очистку воды, в качестве антиоксидантов, гидрогелей, мембран, биосенсоров, в тканевой инженерии и доставке лекарств (Elsabee et al., 2009; Honarkar and Barikani, 2009). На сегодняшний день известно более 70 направлений практического применения хитозана и его производных (таблица 1).

Таблица 1 – Основные области применения хитозана

Область	Применение	Источник
Биомедицинские и фармацевтические материалы	Полимерная матрица для направленной доставки лекарственных веществ с пролонгированным высвобождением путем их медленной диффузии	Скрябин К. Г. и др., 2013; Quiñones J. P. et al., 2018; Wang J. et al., 2017; Cánepa C. et al., 2017;
	Вспомогательное и формообразующее вещество в комбинации с активным агентом, обеспечивающее контролируемое высвобождение состава	Huang G. et al., 2017; Foda N. H. et al., 2007; Dhanaraj S. A. et al., 2014;
	Адъюванты для вакцин	Makhlof A. et al., 2011; Chavana C. et al., 2017; Lin, H.-Y. et al., 2010
	Гидрогели различной структуры в качестве основы для ранозаживляющих повязок	Скрябин К. Г. и др., 2013; Wu T. et al., 2017;

Область	Применение	Источник
		Liu H. A. et al., 2018; Murakami K. et al., 2010; Shen E. C. et al., 2008; Boddohi S. et al., 2009; Il'ina A. V. et al., 2005
	Компонент тканевой инженерии – кожных, костных, хрящевых, нервных, тканей печени (придает механическую прочность, биодеградирует, облегчая рост новой ткани, и является клеточной и молекулярной основой для миграции и культивации на нем необходимых клеток)	Lian Q. et al., 2009; Martino Di et al., 2005; Hu Q. et al., 2004; Wu Y. et al., 2009; Chevrier A. et al., 2007; Ilbasimis-Tamer S. et al., 2017; Ribeiro J. C. V. et al., 2017
	Гемостатики	Pogorielov V. M. et al., 2015
	Шовный материал (гипоаллергенность)	Yang Y. et al., 2017
	Сорбент. Нормализация холестеринового обмена, состава микробиоты и перистальтики кишечника	Shakeel A. et al., 2016
Сельское хозяйство	Средства для обработки семян с целью повышения урожайности (индуктор болезнеустойчивости, росторегулирующее вещество, так как при разложении образуются соединения азота)	Васюкова Н. И. с соавт., 2006; Байрамбеков Ш. Б. с соавт., 2012
	Средство лечения и профилактики кишечных расстройств молодняка сельскохозяйственных животных не разрушается при прохождении многокамерного желудка	

Область	Применение	Источник
Пищевые и кормовые добавки	Корма для животных и рыб (так как является адсорбентом тяжёлых металлов и радионуклидов, снижает уровень загрязнения продуктов животноводства)	Сафронова Т. М. с соавт., 2002; Silvia Bautista-Banos et al., 2016; Топурия Г. М. с соавт., 2014;
	Консервант (N-карбоксиметилхитозан предотвращает окисление атомов железа и последующую серию реакций, нарушающую вкусовые качества и порчу мясной продукции)	
	Препараты, повышающие лёжкость плодоовощной продукции	
Косметология	Гелеобразующее, увлажняющее, плёнкообразующее и противовоспалительное средство (крема, шампуни, дезодоранты, гели для душа, средства для укладки волос)	Patent US 8236781B2, 2009; Aranaz I. et al., 2018

В качестве активного агента в хитозановых биологических системах могут включаться пептиды, нуклеиновые кислоты, факторы роста, витамины, противовоспалительные, антибактериальные, противоопухолевые и другие лекарственные средства. Известно применение хитозана для пролонгированного высвобождения лекарственных соединений, таких как паклитаксел, протеины, небольшие фрагменты РНК, антигены. Также проводятся исследования по апробации разнообразных путей введения микрочастиц в организм (орально, буккально, ингаляционно, интернозально, внутримышечно, трансдермально), наибольшее внимание уделяется неинвазивным методам (Park et al., 2007; De la Fuente et al., 2008; Liu and De Yao, 2002; Van der Lubben et al., 2001).

Хитозан активно позиционируется на рынке как пищевая/кормовая добавка с иммуностимулирующими свойствами, на сегодняшний момент мировой фармацевтический рынок предоставляет первые зарегистрированные лекарственные препараты для наружного применения (мази, гели, ранозаживляющие пленки). Использование хитозана и его производных для парентерального вве-

дения находится на экспериментальной стадии (Mao et al., 2010; Custódio et al., 2010; Isikli et al., 2012; Zan et al., 2008; Park et al., 2007).

На сегодняшний день использование экзосомальных и хитозановых частиц имеет широкое распространение. Препараты, получаемые на их основе, уже проходят клинические испытания в медицине, что подтверждает их перспективность. Что касается применения в ветеринарной медицине, в доступной литературе не удалось найти источников, подтверждающих разработку и использование препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц. Применение хитозана сводится к сорбентным композициям, кормовым добавкам и адъювантам для вакцин. В этой связи является актуальным проведение исследований по внедрению элементов данных технологий в разработке селективных лекарственных средств ветеринарного назначения.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы 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».

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 в возрасте 2,5–3,0 месяца.

Лабораторные животные предварительно были помещены в комнату карантинирования и адаптации на 14 суток. Во время этого периода осуществляли ежедневную регистрацию клинических параметров животных. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в экспериментальные группы включены не были. Подопытных животных распределяли по группам рандомизировано. В качестве критерия принималась масса тела, таким образом, чтобы индивидуальное значение веса не отклонялось от среднего показателя более чем на 10 % (весы ВК-150.1.e = 0,005 г, «Масса-К», Санкт-Петербург. Свидетельство о поверке № 28/124). Каждому животному был присвоен индивидуальный номер, клетки снабжались этикетками с указанием шифра исследования, вида, пола и группы животных.

Рисунок 4 – Структура научных исследований



Разработка и изучение фармакокинетических свойств селективных препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц. Разработку препаратов осуществляли совместно с лабораторией биохимии ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» и ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет». В процессе выполнения диссертационных исследований были разработаны два способа извлечения экзосом из крови путем ультрацентрифугирования и ультрафильтрации. Получено два антибактериальных препарата на основе экзосомальных («Экзазит») и хитозановых («Хитазит») частиц, обладающих выраженным селективным действием. Сущность методов извлечения экзосом из крови и разработки препаратов подробно описана в разделе 2.2.1.

Средний размер и морфологию наночастиц изучали методом сканирующей зондовой микроскопии в электронном микроскопе для биологических исследований EVO LS 10 (Carl Zeiss, NTS Германия). Гомогенность препаратов оценивали на основании данных проточной цитометрии (Attune, Applied Biosystems, США).

Концентрацию азитромицина в дисперсиях наночастиц и клинических образцах определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Ultimate 3000 (Dionex Corp., США), во всех экспериментах использовалась колонка Reprosil-Pur 300 ODS-3 (250×3 мм, размер частиц 5 мкм). Элюирование проводилось в изократическом режиме с применением двух подвижных фаз: 20 мМ раствор ацетата аммония, рН 4,70 и ацетонитрил, соотношение фаз 90:10, скорость потока 0,4 мл/мин. Температура термостата колонки 25 °С. Объем вводимой пробы 10 мкл, детекция проводилась при 252 нм.

Эффективность инкапсуляции рассчитывали по формуле

$$\text{ЭФ} = \frac{C_{\text{исх}} - C_{\text{своб}}}{C_{\text{исх}}} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где ЭФ – эффективность включения, %; $C_{\text{исх}}$ – исходная концентрация азитромицина в реакционной среде, мкг/мл; $C_{\text{своб}}$ – концентрация азитромицина в супернатанте, мкг/мл.

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.

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).

Эксперименты на животных проводили согласно правилам, принятым Директивой 2010/63/eu Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года, по охране животных, используемых в научных целях (DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on the protection of animals used for scientific purposes. 22 September 2010), Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986) и приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977.

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 согласно схеме, указанной в таблицах 1 и 8. 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). Данные, полученные на самках и самцах, учитывались и анализировались отдельно. Препараты вводили посредством внутрижелудочного зонда в течение 14 суток согласно схеме, указанной в таблице 15.

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 сенсibilизировали путем перорального введения препарата ежедневно в течение 30 дней. Тестирование сенсibilизирующих 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 непрямого 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°C 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 смыв, стекающий с петель кишечника, в смоченную гепарином пробирку. Препараты готовили на обезжиренных предметных стеклах, окрашенных 0,3 % спиртовым раствором нейтрального красного и высу-

шенных 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 х20. Оценку результатов проводили методом подсчёта процента дегранулированных тучных клеток

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

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 (D_t) 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 (SDt). Значения

SDt, полученные на разных этапах испытания, последовательно суммировали, а результаты сравнивали с уровнями. 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 клинико-терапевтической эффективности препаратов «Экзазит» и «Хитазит». Исследование сравнительной клинико-терапевтической эффективности проводили в ООО «СХП Новомарьевское» Шпаковского района Ставропольского края.

Для изучения сравнительной клинико-терапевтической эффективности препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц сформировали три группы ягнят (2,5–3 месяца, $n = 15$) с диагностированной острой катаральной бронхопневмонией. 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 1 мл на 20 кг массы животного 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 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

$$\text{ИЯСН} = \frac{A}{B}, \quad (3)$$

где A – \sum несегментированных нейтрофилов, %;

В – сегментоядерные нейтрофилы, %.

В процессе анализа полученных морфобioхимических 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 мультистейнер 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 главе изложены результаты исследований, проведенных в период с 2015 по 2020 год и опубликованных в научных трудах Е. С. Кастарновой, В. А. Оробца (2015, 2015), V. A. Orobets, E. S. Kastarnova (2015), Е. С. Кастарновой, В. А. Оробца (2016), E. S. Kastarnova, V. A. Orobets, V. N. Shashova (2016), Е. С. Кастарновой (2017), Е. С. Кастарновой (2019), Е. С. Кастарновой, В. А. Оробца, О. И. Севостьяновой, В. Н. Шаховой (2019), Е. С. Кастарновой, В. А. Оробца, Д. А. Ковалева, О. И. Севостьяновой, В. Н. Шаховой (2019), E. S. Kastarnova, V. A. Orobets, V. N. Shahova, O. I. Sevostyanova, N. I. Kizilova (2019), V. I. Trukhachev, V. A. Orobets, E. S. Kastarnova, V. N. Shahova (2019), E. Kastarnova, V. Orobets, V. Shahova, O. Sevostyanova, I. Belyaev, E. Grudeva (2020), Е. С. Кастарновой, В. А. Оробца (2020).

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

Наночастицы экзосом с включенным азитромицином («Экказит») получали методом последовательной электропорации и инкубирования. В процессе оптимизации условий получения экзосомальной субстанции разработаны два способа извлечения экзосом из крови, путем ультрацентрифугирования и ультрафильтрации.

Метод ультрацентрифугирования основан на сборе периферической крови и разделении на плазму и клеточную фракцию путем центрифугирования при 500 g в течение 15 мин. Клеточную фракцию крови подвергают последовательной обработке буферным раствором PBS (10 мМ фосфатный буфер, 0,15 М NaCl, рН 7,4), содержащим 5 мМ ЭДТА (10 мин инкубация с последующим центрифугированием 20 минут при 500 g, сбор первого супернатанта), затем осуществляют встряхивание посредством V3 «Vortex» (скорость вращения 2000 об/мин) пробирки с последующим центрифугированием 10 мин при 500 g и сбор второго супернатанта. Плазму и полученные супер-

натанты из клеточной фракции, содержащие экзосомы, связанные с поверхностью форменных элементов, объединяют и используют в качестве исходного материала для получения суммарного пула экзосом крови. Для этого из объединенного образца удаляют клеточный дебрис центрифугированием при 30 000 g в течение 10 мин, экзосомы осаждают ультрацентрифугированием в ультрацентрифужных фильтровальных пробирках с диаметром пор 0,1 мкм при 100 000 g в течение 60 мин (патент РФ 2608509). Визуализацию и идентификацию структурных компонентов, полученных экзосомальных дисперсий осуществляли методом электронной микроскопии (рисунок 5). 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. Размер частиц располагался в диапазоне от 40 до 450 нм (в среднем около 200 нм).

Метод ультрафильтрации основан на сборе крови, разделении на плазму и клеточную фракцию путем центрифугирования при 300 g в течение 15 мин. Клеточную фракцию крови подвергают последовательной обработке буферным раствором PBS (5 мин инкубация с последующим центрифугированием 25 мин при 400 g), сбор супернатанта № 1; затем резкое встряхивание пробирки посредством V3 «Vortex» (скорость вращения 2000 об/мин) с последующим центрифугированием 20 мин при 400 g, сбор супернатанта № 2. Плазму и полученные супернатанты из клеточной фракции, содержащие экзосомы, связанные с поверхностью форменных элементов, объединяют и используют в качестве исходного материала для получения суммарного пула экзосом крови. Затем из полученного образца удаляют клеточный дебрис посредством ультрафильтрации через ультрафильтрационную ячейку (8200, 200 мл, Millipore) с мембраной МФАС-ОС-1 (диаметр пор 0,220мкм) под давлением 2 атм. Полученный фильтрат подвергают повторной ультрафильтрации через мембрану УПМ-50 (диаметр пор 0,05мкм) под давлением 2 атм (патент РФ 2651521).

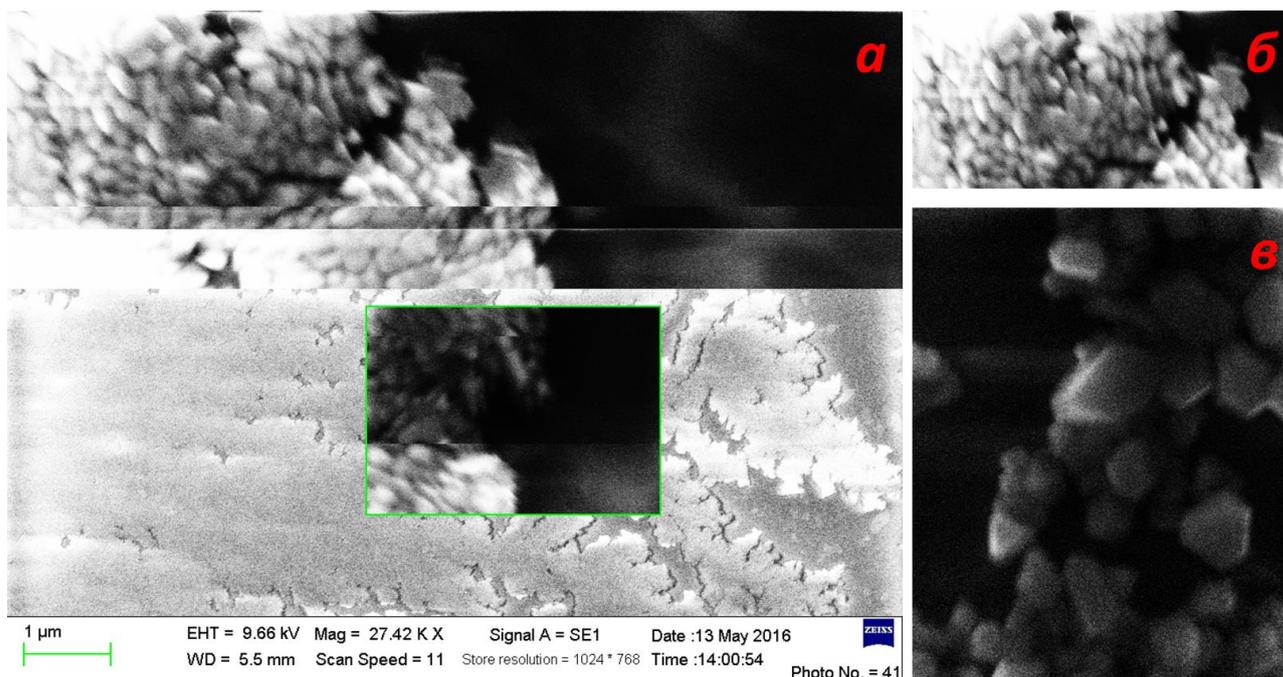


Рисунок 5 – Электронная микрофотография образца экзосом, полученных методом ультрафильтрации: *а* – рабочее изображение с прибора Carl Zeiss EVO LS 10; *б* – увеличение $\times 27420$, увеличение $\times 49000$

Наночастицы экзосом с включенным азитромицином (экзазит) получали методом электропорационного инкубирования. Качество полученной суспензии экзосом оценивали по нескольким параметрам: размерные характеристики, стабильность экзосом, степень включения препарата в %. Размер экзосомальных частиц определяли методом динамического светорассеяния на лазерном корреляционном спектрометре (анализатор NANO-flex, Microtrac, США). Концентрация азитромицина определялась методом УФ-спектрофотометрии, рассчитывалась степень включения азитромицина. Измерения проводились для каждой свежеприготовленной суспензии не менее 3 раз ($n = 3$). Некачественные суспензии исключались из дальнейшего анализа (таблица 2).

Таблица 2 – Усредненные исследованные характеристики суспензий экзосом

Исследуемый параметр	Среднее значение ($n = 3$)
Средний диаметр экзосом, нм	101,36±15,3
Средний диаметр экзосом при хранении (7 дней, 20 °С), нм	103,19±21,1
Агрегативная устойчивость (стабильность), дни	8,12 ± 1,5
Концентрация азитромицина, мг/мл	50,53±0,09
Степень включения препарата, %	77,4

Наночастицы хитозана с включенным азитромицином (хитазит) получали методом ионной кросс-сшивки по модифицированному методу Calvo et al. (1997). Хитозан растворяли в 1 % уксусной кислоте до концентрации 3 мг/мл и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм (Millipore, США). К раствору хитозана добавляли раствор азитромицина и триполифосфата натрия при перемешивании на диспергаторе Ultra-Turrax (IKA, Германия) при 2500 об/мин в течение 30 мин. Затем взвесь частиц центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин при температуре 4 °С, дважды промывали водой. Полученный препарат хранили при температуре 2–8 °С.

В ходе оптимизации условий формирования наночастиц было обнаружено, что ионная кросс-сшивка происходит в узком диапазоне концентраций хитозана и триполифосфата натрия в реакционной среде (0,5–2,0 и 0,25–1,25 мг/мл соответственно). Большие концентрации реагентов способствуют образованию макрочастиц, а низкие концентрации – резкому снижению выхода наночастиц. Существенное влияние на качество дисперсии оказывает также соотношение хитозан/триполифосфат. Показано, что увеличение в реакционной смеси доли триполифосфата приводит к увеличению размера частиц (рисунок 6).

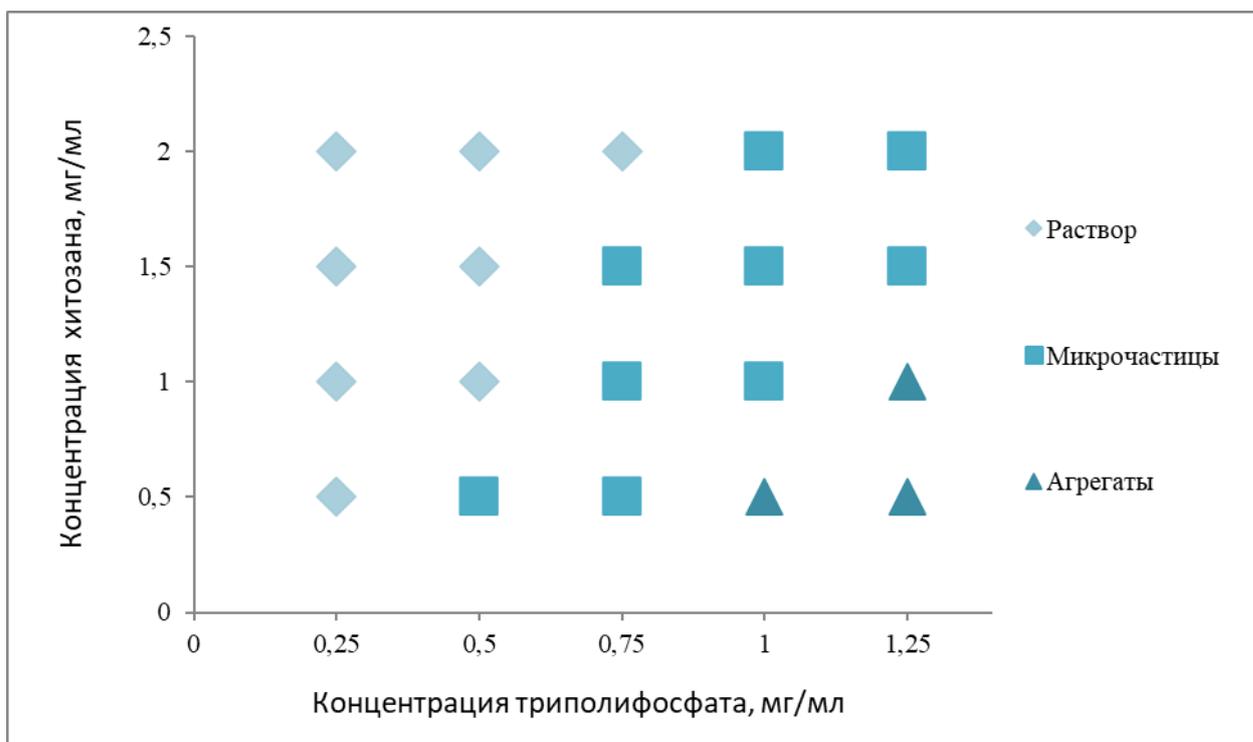


Рисунок 6 – Зависимость образования наночастиц хитозана с включенным азитромицином от концентрации компонентов

Среднее значение размера частиц в препаратах составило $100,41 \pm 50,64$ нм. 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. Размер подобных комплексов находится в диапазоне от 400 нм до 2 мкм. Данные проточной цитометрии экспериментальных образцов препаратов, содержащих частицы на основе хитозана с включенным антибиотиком, свидетельствуют об относительной гомогенности полученных дисперсий.

Эффективность включения азитромицина в наночастицы хитозана зависит от концентрации компонентов частиц и пропорциональна количеству хитозана в реакционной смеси. Наибольшая эффективность включения азитромицина (до 86,6 %) была получена при соотношении количества вещества хитозан/триполифосфат 1,5/1.

Для изучения профиля высвобождения азитромицина из наночастиц хитозана *in vitro* 1 мл свежеполученной дисперсии помещали в диализный

мешок (12–14 кДа, ширина 10 мм), который, в свою очередь, переносили в стакан, содержащий 100 мл 0,02 М фосфатно-солевого буфера (рН 2,12, 4,76 и 7,21). Раствор с погруженным диализным мешком перемешивали на магнитной мешалке при 50 об/мин и температуре 37 ± 1 °С. На основании данных о содержании антибиотика в образцах строили график зависимости процентной доли высвобожденного антибиотика от времени. Характер и скорость высвобождения инкапсулированного в наночастицы вещества является одним из важнейших параметров препарата. Большая часть свободного азитромицина высвобождается из диализного мешка в первые шесть часов (рисунок 7). Согласно полученным данным высвобождение антибиотика из частиц происходит неравномерно. Наиболее интенсивно процесс происходит в средах с низким рН. Так, в кислых растворах происходит высвобождение 50 % препарата за первые 24 ч, тогда как при диализе в нейтральном растворе происходит высвобождение 30 % препарата.

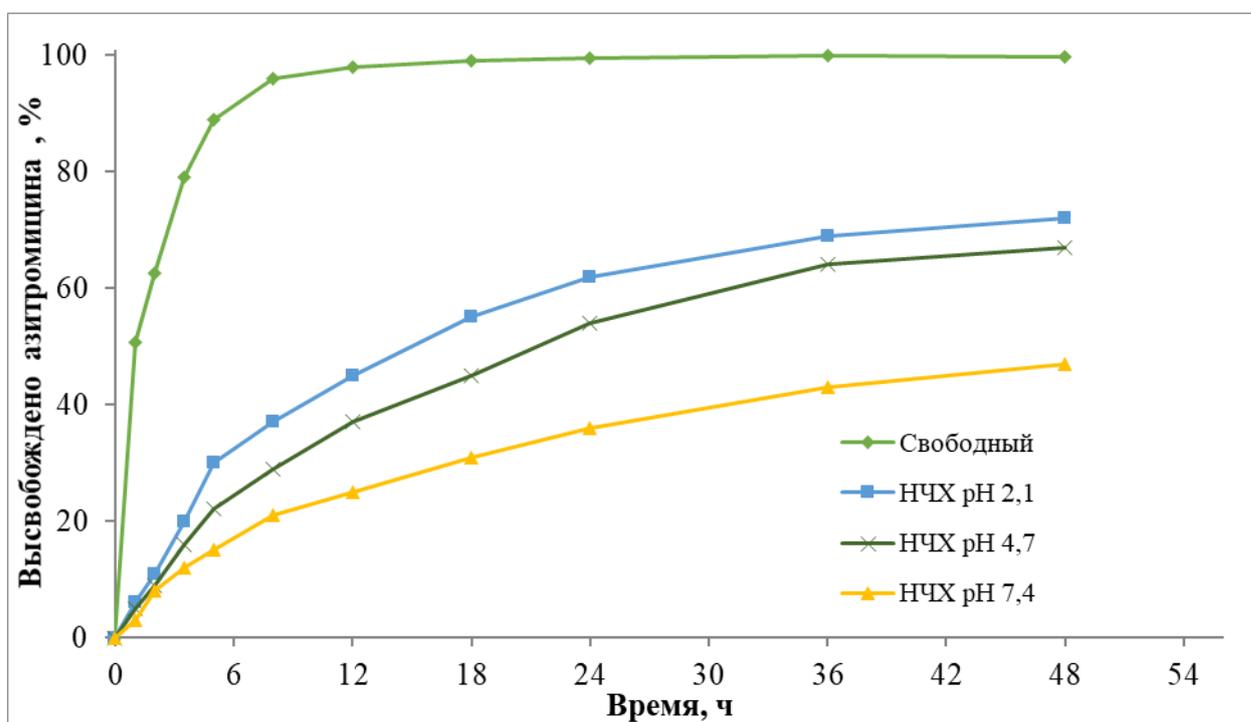


Рисунок 7 – Переход в раствор азитромицина в ходе диализа

Высвобождение лекарственного вещества из наночастиц хитозана идет по нескольким механизмам: набухание полимера (Liu, S. et al., 2017),

диффузия препарата через полимер, эрозия или деградация матрицы полимера и комбинация эрозии и деградации (Singh R. et al., 2009). Первоначальный выброс из наночастиц хитозана инкапсулированного вещества протекает по механизму набухания полимера, образованию пор или диффузии лекарственного средства с поверхности полимера (Yuan Z. et al., 2013; Miladi K. et al., 2015; Huang Y. et al., 2015). Наблюдаемое высвобождение азитромицина *in vitro*, по всей видимости, происходит так же через первоначальную стадию набухания частиц с последующей рН-зависимой эрозией наночастиц. Высвобождение антибиотика *in vivo* происходит быстрее, чем в условиях *in vitro*, поскольку разрушение наночастицы хитозана дополнительно ускоряется ферментативным разрушением полимерной цепи (Göpferich A., 1996).

Изучение фармакокинетических свойств препаратов «Экзазит» и «Хитазит» осуществлялось посредством внутримышечного введения препаратов белым мышам в дозе 0,01, 0,03, 0,05, 0,07 и 0,09 мл/кг. Установлено, что оптимальная терапевтическая концентрация достигалась при введении препаратов в дозе 0,05 мл/кг.

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 8).

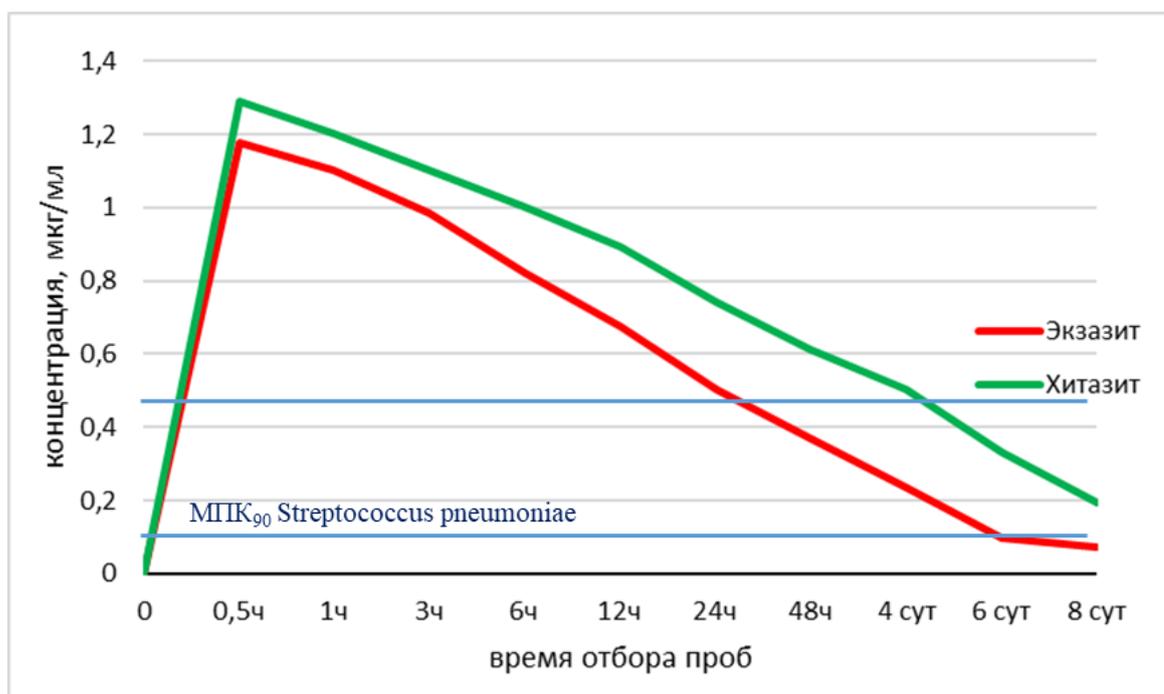


Рисунок 8 – Динамика концентрации препаратов «Экзазит» и «Хитазит» в плазме крови

После однократной внутримышечной инъекции препаратов «Экзазит» и «Хитазит» в дозе 0,05 мл/кг минимальная подавляющая концентрация отмечалась через 12 ч, достигая максимального уровня в легочной ткани на 5-е сутки, и сохранялась на протяжении 14 суток (рисунок 9).

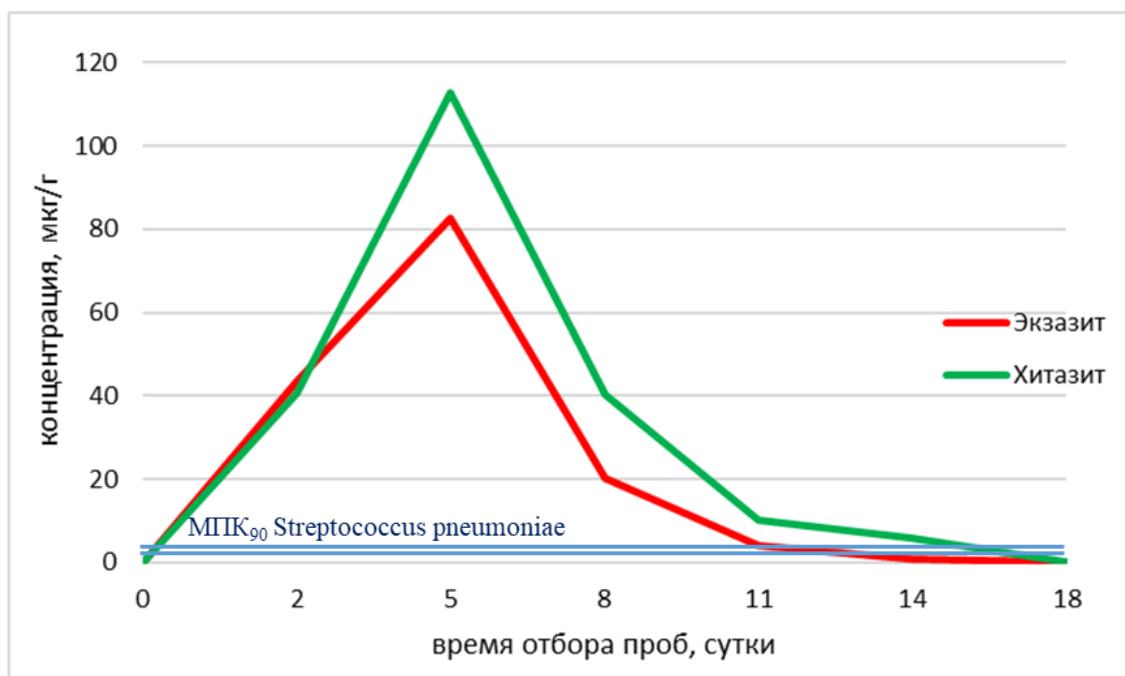


Рисунок 9 – Динамика концентрации препаратов «Экзазит» и «Хитазит» в легочной ткани

При снижении концентрации препаратов «Экказит» и «Хитазит» в плазме крови происходило одновременное повышение концентрации в легочной ткани. Терапевтическая концентрация антибиотика сохраняется в течение 14 суток и не требует введения новых доз препарата в организм извне, что и предопределяет возможность однократного введения препаратов при антибактериальной терапии. При этом спустя 14 суток после последнего введения препаратов «Экказит» 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).

Таким образом, разработаны селективные препараты на основе экзосомальных («Экказит») и хитозановых («Хитазит») наночастиц, проведен анализ их физико-химических и фармакокинетических свойств. Посредством фармакокинетических исследований, проведенных на белых мышах, установлено, что при введении препаратов «Экказит» и «Хитазит» максимальная концентрация антибиотика в легочной ткани превышает плазменные показатели в 70 и 91 раз соответственно. Разработанные препараты «Экказит» и «Хитазит» обладают селективностью к легочной ткани.

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

2.2.2.1. Определение острой токсичности препарата «Экказит» на белых мышах и крысах при внутрижелудочном введении

Для оценки острой токсичности сформировали опытные и контрольные группы белых крыс и белых мышей ($n = 10$). Препарат вводили посредством внутрижелудочного зонда согласно схеме, указанной в таблице 3.

Таблица 3 – Схема внутрижелудочного введения препарата «Экказит» белым мышам и крысам для определения острой токсичности

№ группы	Доза препарата, мг/кг	
	Белые мыши	Белые крысы
1	4000	4000
2	6000	6000
3	8000	8000
4	10000	10000
5	12000	12000
Контроль	Равный объем физиологического раствора	Равный объем физиологического раствора

В течение 14 суток проводили наблюдение за общим состоянием и поведением животных, проявлением симптомов интоксикации, а также возможной гибелью. Контроль массы тела крыс опытных и контрольной групп проводили в день постановки опыта (до введения препарата), а также на 1, 3, 7, 9 и 14-е сутки (таблицы 4–5).

Таблица 4 – Результаты взвешивания белых мышей при применении препарата «Экказит», г

№ жив-го	Группа					
	Контроль	1-я опытная	2-я опытная	3-я опытная	4-я опытная	5-я опытная
До введения препарата						
Хср±Δ	19,4±3,74	20,3±3,12	19,6±4,27	17,2±3,11	19,7±4,19	18,6±3,02
1-е сутки						
Хср±Δ	19,4±3,74	20,3±3,12	20,2±4,30	20,66±3,78	25	–
3-и сутки						
Хср±Δ	22,5± 3,74	23,2±3,04	23,1± 3,82	23,66±3,78	28	–
7-е сутки						
Хср±Δ	25,1± 3,74	26,2±3,04	24,8±3,44	26,66±3,78	30	–

№ жив-го	Группа					
	Контроль	1-я опытная	2-я опытная	3-я опытная	4-я опытная	5-я опытная
9-е сутки						
Хср±Δ	26,4±3,23	27,1±1,79	25,4±2,83	27,3±3,21	32	-
14-е сутки						
Хср±Δ	29,8±2,61	30,4±1,95	31,2±1,65	31,3±2,21	35	-

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

Таблица 5 – Результаты взвешивания белых крыс при применении препарата «Экзазит», г

№ жив-го	Группа					
	Контроль	1-я опытная	2-я опытная	3-я опытная	4-я опытная	5-я опытная
До введения препарата						
Хср±Δ	184,2±2,78	184,7±2,79	186,1±1,79	185,1±2,23	184,4±2,79	184,4±2,59
1-е сутки						
Хср±Δ	184,2±2,78	184,7±2,79	186,1±1,87	185,6±1,51	188,3±1,41	-
3-и сутки						
Хср±Δ	194,5±2,12	194,5±2,06	195,3±2,64	194,8±2,58	192,5±0,70	-
7-е сутки						
Хср±Δ	215,3±3,02	215,8±2,09	213,6±2,36	215,7±2,75	214,2±5,65	-
9-е сутки						
Хср±Δ	223,5±2,59	224,5±2,36	224,6±1,87	223,8±3,19	222,1±2,82	-
14-е сутки						
Хср±Δ	251,6±3,89	254,3±3,12	254,6±3,24	254,8±3,76	255,4±3,12	-

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

Регистрация массы тела животных опытных и контрольных групп до введения препарата, а также на 1, 3, 7, 9 и 14-е сутки не выявила достоверно различимых показателей при внутрижелудочном введении препарата «Экзазит».

При изучении острой токсичности препарата «Экзазит» на белых мышках и крысах установлено, что латентный период отравления составлял 25–90 мин и зависел от дозировки. Летальный исход регистрировали пре-

имущественно в течение первых 24 ч, а при применении высоких доз животные погибали через 1,5–3,5 ч. Клинические признаки острого отравления у белых крыс сопровождались сонливостью, нарушением дыхания, атаксией, параличом. Непосредственно перед гибелью у животных отмечали тахикардию и учащенное дыхание, которое становилось поверхностным, прерывистым. Смерть наступала в состоянии глубокого угнетения.

На основании результатов первичных токсикометрических исследований были получены данные для исчисления величины LD₅₀ экзосомального препарата (таблицы 3–6) при пероральном введении белым мышам и крысам. Данные исследований позволили установить параметры острой токсичности препарата «Экзазит» при внутрижелудочном введении (таблица 7).

Таблица 6 – Расчёт LD₅₀ препарата «Экзазит» методом Миллера и Тейнтера

Группа лабораторных животных	Доза препарата, мг/кг	Количество животных		% гибели	Соответствующие пробиты	Весовой коэффициент пробит
		выживших	павших			
Белые мыши						
1	4000	10	0	0	3,04	1,0
2	6000	9	1	10,0	3,72	2,6
3	8000	3	7	70,0	5,52	4,5
4	10000	1	9	90,0	6,28	2,6
5	12000	0	10	100,0	6,96	1,2
Белые крысы						
1	4000	10	0	0	3,04	1,0
2	6000	9	1	10,0	3,72	2,6
3	8000	5	5	50,0	5,00	5,0
4	10000	2	8	80,0	5,84	3,9
5	12000	0	10	100,0	6,96	1,2

LD₅₀ при внутрижелудочном введении препарата «Экзазит» 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 7 – Параметры острой токсичности препарата «Экказит» при внутрижелудочном введении, мг/кг

Вид животных	Параметр токсичности					SLD ₅₀
	МПД	LD ₁₆	LD ₅₀	LD ₈₄	LD ₁₀₀	
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 «Экказит» 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

Для оценки острой токсичности сформировали опытные и контрольные группы белых крыс и белых мышей ($n = 10$). Препарат вводили посредством внутрижелудочного зонда согласно схеме, указанной в таблице 8.

Таблица 8 – Схема внутрижелудочного введения препарата «Хитазит» белым мышам и крысам для определения острой токсичности

№ группы	Доза препарата, мг/кг	
	Белые мыши	Белые крысы
1	4000	4000
2	6000	6000
3	8000	8000
4	10000	10000
5	12000	12000
Контроль	Равный объем физиологического раствора	Равный объем физиологического раствора

В течение 14 суток проводили наблюдение за общим состоянием и поведением животных, проявлением симптомов интоксикации, а также возможной гибелью. Контроль массы тела белых мышей и крыс опытных и контрольной групп проводили в день постановки опыта (до введения препарата), а также на 1, 3, 7, 9 и 14-е сутки (таблицы 9, 10).

Таблица 9 – Результаты взвешивания белых мышей
при применении препарата Хитазит, г

№ жив-го	Группа					
	Контроль	1-я опытная	2-я опытная	3-я опытная	4-я опытная	5-я опытная
До введения препарата						
Хср±Δ	19,7±3,59	20,5±3,97	20,4±3,71	19±4,18	19,7±4,19	18,7±3,80
1-е сутки						
Хср±Δ	19,7±3,59	20,5±3,97	21,6±3,02	21,5±4,94	–	–
3-и сутки						
Хср±Δ	22,3±2,83	23,4±3,71	24,6±2,55	24±2,82	–	–
7-е сутки						
Хср±Δ	25,5±1,95	25,5±2,01	26,3±1,40	26±2,82	–	–
9-е сутки						
Хср±Δ	27,5±1,84	26,9±1,52	27,6±1,18	27,5±2,12	–	–
14-е сутки						
Хср±Δ	32,0±1,82	31,2±1,68	32,6±1,84	33,0±1,41	–	–

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

Таблица 10 – Результаты взвешивания белых крыс
при применении препарата «Хитазит», г

№ жив-го	Группа					
	Контроль	1-я опытная	2-я опытная	3-я опытная	4-я опытная	5-я опытная
До введения препарата						
Хср±Δ	184,2±2,48	185,3±1,33	185,3±1,76	184,8±1,98	184,9±2,02	185,1±1,66
1-е сутки						
Хср±Δ	184,2±2,48	185,3±1,33	186,44±1,42	187,0±1,63	187	–
3-и сутки						
Хср±Δ	195,2±1,75	194,7±1,63	194,7±1,85	192,7±2,62	193	–
7-е сутки						
Хср±Δ	214,8±3,22	215,4±2,01	215,7±2,53	217,5±1,0	213	–
9-е сутки						
Хср±Δ	225,4±2,01	225,4±2,22	224,5±2,92	223,7±1,70	223	–

№ жив-го	Группа					
	Контроль	1-я опытная	2-я опытная	3-я опытная	4-я опытная	5-я опытная
14-е сутки						
Xcp±Δ	252,0±5,09	255,5±2,46	254,6±2,95	253,7±1,70	252	–

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

При изучении острой токсичности препарата «Хитазит» на белых мышях и крысах установлено, что латентный период отравления составлял 20–70 мин и зависел от дозировки. Летальный исход регистрировали преимущественно в течение первых 24 ч, а при применении высоких доз животные погибали через 1–2,5 часа. Клинические признаки острого отравления у белых крыс сопровождались сонливостью, нарушением дыхания, атаксией, параличом. Непосредственно перед гибелью у животных отмечали тахикардию и учащенное дыхание, которое становилось поверхностным, прерывистым. Смерть наступала в состоянии глубокого угнетения. Регистрация массы тела животных опытных и контрольных групп до введения препарата, а также на 1, 3, 7, 9 и 14-е сутки не выявила достоверно различимых показателей при внутрижелудочном введении препарата «Хитазит».

На основании результатов первичных токсикометрических исследований были получены данные для исчисления величины LD₅₀ препарата «Хитазит» (таблицы 8–11) при пероральном введении белым мышам и крысам. Данные исследований позволили установить параметры острой токсичности препарата «Хитазит» при внутрижелудочном введении (таблица 12).

LD₅₀ при внутрижелудочном введении препарата «Хитазит» 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 11 – Расчёт LD₅₀ препарата «Хитазит»
методом Миллера и Тейнтера

Группа лабораторных животных	Доза препарата, мг/кг	Количество животных		% гибели	Соответствующие пробиты	Весовой коэффициент пробит
		выживших	павших			
Белые мыши						
1	4000	10	0	0	3,04	1,0
2	6000	8	2	20,0	4,16	3,5
3	8000	2	8	80,0	5,84	3,9
4	10000	0	10	100,0	6,96	1,2
5	12000	0	10	100,0	6,96	1,2
Белые крысы						
1	4000	10	0	0	3,04	1,0
2	6000	9	1	10,0	3,72	2,6
3	8000	4	6	60,0	5,25	4,8
4	10000	1	9	90,0	6,28	2,6
5	12000	0	10	100,0	6,96	1,2

Таблица 12 – Параметры острой токсичности препарата «Хитазит»
при внутриведочном 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*

Для оценки субхронической пероральной токсичности сформировали опытные и контрольные группы белых крыс ($n = 10$). Разработанные препараты вводили посредством внутрижелудочного зонда в течение 14 суток согласно схеме, указанной в таблице 13.

Таблица 13 – Схема внутрижелудочного введения препаратов белым мышам и крысам для изучения субхронической токсичности

Группа	Количество крыс	Доза, мг/кг
Экзазит		
1	10	811 (1/10 от LD ₅₀)
2	10	405 (1/20 от LD ₅₀)
3	10	162 (1/50 от LD ₅₀)
4	10	раствор для инъекций (контроль)
Хитазит		
1	10	770 (1/10 от LD ₅₀)
2	10	385 (1/20 от LD ₅₀)
3	10	154 (1/50 от LD ₅₀)
4	10	Раствор для инъекций (контроль)

При изучении субхронической токсичности на крысах установлено, что многократное применение препаратов во всех испытанных дозах не вызывает значимых изменений в клиническом состоянии белых крыс. Поведенческие реакции, поедание корма и потребление воды, частота дыхания у всех животных опытных групп оставались в пределах нормы и не отличались от контроля. За период наблюдения у крыс, находящихся в опыте, не было выявлено расстройств пищеварения и мочеотделения. Случаев летального исхода среди животных в ходе опыта не было. Животные охотно поедали корм, равномерно прибавляли в весе. Достоверных различий по данному показателю в ходе опыта не было отмечено. Не выявлено зависимости от уровня дозирования препарата (таблица 14).

Таблица 14 – Динамика прироста массы тела белых аутбредных крыс после многократного применения препаратов «Экзазит» и «Хитазит»

Группа животных, доза, мг/кг	Масса животного, г			
	Исходная	7-е сутки	14-е сутки	24-е сутки
Экзазит				
Контроль	195,2±2,22	204,9±3,45	215,6±5,47	227,4±6,38
811	194,8±3,73	206,2±3,77	214,5±6,37	226,2±7,01
405	193,2±2,21	204,6±4,63	215,2±5,76	228,5±7,72
162	197,0±3,24	209,5±3,62	217,3±6,26	229,4±7,38
Хитазит				
Контроль	194,6±3,62	206,8±3,62	219,0±4,83	230,8±8,10
770	194,0±3,63	207,5±4,35	213,8±7,55	225,9±6,57
385	195,4±1,74	204,7±4,21	217,6±4,57	225,9±8,38
154	196,2±1,27	207,9±3,88	219,8±5,63	228,0±6,48

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

При оценке влияния препаратов «Экзазит» и «Хитазит» на функциональное состояние центральной нервной системы (ЦНС) отмечено, что крысы сохраняли двигательную активность, сопоставимую с активностью у контрольных животных. Подопытные крысы адекватно реагировали на внешние раздражители. Результаты гематологического анализа периферической крови крыс после курса применения препарата через 1 день и через 10 дней после последнего введения показали, что количество эритроцитов, лейкоцитов и лейкограмма в испытуемом диапазоне существенно не изменялись и колебались в пределах контрольных величин (таблицы 15, 16). Все незначительные изменения, обнаруженные в гематологической картине крови подопытных крыс, соответствовали референсным значениям для данного вида животных.

Таблица 15 – Влияние препаратов «Экзазит» и «Хитазит»
на гематологические показатели крови у белых аутбредных крыс,
через 1 сутки после последнего введения препарата

Показатель		Группа животных, доза, мг/кг			
		Контроль	811	405	162
Экзазит					
Эритроциты, $10^{12}/л$		7,46±0,23	7,61±0,25	7,52±0,17	7,41±0,16
Гемоглобин, г/л		115,1±15,23	117,3±15,17	118,6±11,74	119,2±14,69
Гематокрит, %		41,5±3,53	41,1±2,43	41,1±3,53	41,4±3,47
Тромбоциты, $10^9/л$		547,5±13,44	553,9±21,21	563,5±26,32	554,2±21,64
Лейкоциты, $10^9/л$		7,01±0,26	7,31±0,25	7,14±0,31	7,25±0,23
Лейкограмма	Нейтрофилы, %	31,18±2,35	32,03±2,64	29,18±2,26	31,84±2,21
	Базофилы, %	0	0	0	0
	Эозинофилы, %	2,37±0,23	2,46±0,39	2,43±0,33	2,37±0,42
	Моноциты, %	2,35±0,39	2,41±0,26	2,59±0,43	2,39±0,38
	Лимфоциты, %	64,1±4,69	63,1±4,49	65,8±4,51	63,4±4,94
Показатель		Группа животных, доза, мг/кг			
		Контроль	770	385	154
Хитазит					
Эритроциты, $10^{12}/л$		7,25±0,24	7,54±0,33	7,50±0,28	7,38±0,34
Гемоглобин, г/л		119,9±13,41	116,2±14,47	117,4±13,23	115,0±14,51
Гематокрит, %		41,8±2,72	41,2±3,56	41,8±3,21	41,3±2,81
Тромбоциты, $10^9/л$		561,0±15,24	560,4±29,32	551,3±28,17	546,6±27,23
Лейкоциты, $10^9/л$		7,13±0,21	7,02±0,23	7,20±0,28	7,07±0,26
Лейкограмма	Нейтрофилы, %	32,15±2,54	31,53±2,67	29,23±2,76	32,81±2,42
	Базофилы, %	0	0	0	0
	Эозинофилы, %	2,41±0,32	2,38±0,52	2,39±0,71	2,40±0,50
	Моноциты, %	2,54±0,53	2,39±0,63	2,48±0,51	2,49±0,66
	Лимфоциты, %	62,9±4,27	63,7±4,28	65,9±4,91	62,3±4,67

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

Таблица 16 – Влияние препаратов «Экзазит» и «Хитазит»
на гематологические показатели крови у белых аутбредных крыс
через 10 суток после последнего введения препарата

Показатель		Группа животных, доза, мг/кг			
		Контроль	811	405	162
Экзазит					
Эритроциты, $10^{12}/л$		7,78±0,20	7,68±0,27	7,54±0,33	7,75±0,49
Гемоглобин, г/л		118,4±14,46	116,3±15,56	117,9±15,13	118,6±14,83
Гематокрит, %		40,1±3,39	39,9±4,40	40,5±3,77	40,9±2,35
Тромбоциты, $10^9/л$		548,3±14,97	551,3±17,86	564,3±27,79	553,6±36,13
Лейкоциты, $10^9/л$		7,21±0,24	7,34±0,24	7,18±0,31	7,28±0,28
Лейкограмма	Нейтрофилы, %	31,01±2,57	31,01±2,83	29,05±2,37	30,47±2,55
	Базофилы, %	0	0	0	0
	Эозинофилы, %	2,26±0,29	2,49±0,35	2,19±0,57	2,36±0,20
	Моноциты, %	2,63±0,39	2,71±0,36	2,96±0,61	2,87±0,36
	Лимфоциты, %	64,1±5,06	63,8±4,01	65,8±5,06	64,3±4,18

Показатель		Группа животных, доза, мг/кг			
		Контроль	770	385	154
Хитазит					
Эритроциты, $10^{12}/л$		7,23±0,12	7,53±0,19	7,52±0,26	7,25±0,18
Гемоглобин, г/л		116,13±15,83	114,83±14,04	116,40±15,78	115,04±14,56
Гематокрит, %		42,17±4,71	42,11±2,74	42,68±4,52	42,17±3,37
Тромбоциты, $10^9/л$		563,18±34,28	549,89±37,38	548,00±18,73	557,93±36,73
Лейкоциты, $10^9/л$		7,25±1,49	7,32±1,48	7,36±1,98	7,04±1,32
Лейкограмма	Нейтрофилы, %	29,81±2,31	31,71±2,58	28,82±2,30	32,64±2,29
	Базофилы, %	0	0	0	0
	Эозинофилы, %	2,35±0,63	2,28±0,53	2,41±0,81	2,61±0,44
	Моноциты, %	2,24±0,53	2,41±0,50	2,27±0,66	2,35±0,62
	Лимфоциты, %	65,6±4,02	63,6±3,74	66,5±4,34	62,4±4,12

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

Как видно из данных биохимических показателей крови, у животных опытных групп не отмечено достоверных и значимых изменений при сопоставлении с аналогичными показателями у контрольных животных (таблица 17). Не выявлено патологических сдвигов в значениях показателей, характеризующих белоксинтезирующую функцию печени – концентрации общего белка и альбумина. Уровень ферментемии, обеих аминотрансфераз претерпевал незначительные колебания в диапазоне, принимаемом за условную норму для данного вида животных, что подтверждает отсутствие активации процессов цитолиза. Таким образом, можно прийти к выводу, что препараты «Экзазит» и «Хитазит» в испытываемом диапазоне доз не оказывают отрицательного воздействия на функциональное состояние печени.

Таблица 17 – Влияние препаратов «Экзазит» и «Хитазит» на биохимические показатели крови у белых аутбредных крыс

Показатель		Группа животных, доза, мг/кг			
		Контроль	811	405	162
Экзазит					
Через сутки после последнего введения					
Общий белок, г/л		63,2±2,17	61,7±2,14	62,5±2,11	62,4±2,14
АсАТ, Ед/л		57,7±29,24	67,7±29,13	69,9±28,80	65,3±27,61
АлАТ, Ед/л		62,4±14,67	68,6±11,56	66,2±11,92	61,4±11,95
ЩФ, Ед/л		337,7±87,16	338,0±86,13	337,0±81,15	333,0±83,15
Мочевина, ммоль/л		7,78±0,39	7,74±0,36	7,74±0,38	7,77±0,35
Глюкоза, моль/л		4,46±0,29	4,48±0,25	4,45±0,28	4,43±0,25

Показатель	Группа животных, доза, мг/кг			
	Контроль	811	405	162
Экказит				
Через 10 суток после последнего введения				
Общий белок, г/л	63,1±2,18	63,6±2,34	64,6±2,17	62,4±2,16
АсАТ, Ед/л	62,3±24,63	67,9±27,48	68,3±25,64	68,6±23,87
АлАТ, Ед/л	67,8±11,84	65,4±11,81	64,5±11,51	66,7±11,64
ЩФ, Ед/л	337,6±83,16	339,7±83,19	337,0±87,15	336,2±85,17
Мочевина, ммоль/л	7,73±0,37	7,75±0,39	7,78±0,37	7,75±0,31
Глюкоза, моль/л	4,44±0,21	4,41±0,28	4,46±0,29	4,45±0,21
Показатель	Группа животных, доза, мг/кг			
	Контроль	770	385	154
Хитазит				
Через сутки после последнего введения				
Общий белок, г/л	64,4±2,20	63,3±2,23	62,5±2,10	63,3±2,11
АсАТ, Ед/л	64,6±20,52	66,3±25,09	66,1±22,76	65,7±28,27
АлАТ, Ед/л	65,4±11,64	66,7±11,45	65,5±11,21	67,4±11,56
ЩФ, Ед/л	336,4±82,52	337,0±85,24	336,4±89,25	333,5±82,57
Мочевина, ммоль/л	7,75±0,37	7,76±0,37	7,75±0,39	7,76±0,33
Глюкоза, моль/л	4,43±0,25	4,47±0,24	4,48±0,25	4,44±0,28
Через 10 суток после последнего введения				
Общий белок, г/л	64,6±2,57	62,8±2,51	65,2±2,78	63,6±2,34
АсАТ, Ед/л	65,5±23,14	63,7±20,81	63,4±26,26	67,3±25,68
АлАТ, Ед/л	66,3±11,46	67,9±11,45	66,6±11,75	64,8±11,43
ЩФ, Ед/л	336,6±84,52	333,6±86,73	335,3±84,63	334,6±88,84
Мочевина, ммоль/л	7,77±0,35	7,76±0,31	7,73±0,39	7,73±0,38
Глюкоза, моль/л	4,47±0,24	4,47±0,23	4,43±0,26	4,47±0,22

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

Данные некропсии крыс обобщены для всех групп исследованных животных, так как по результатам макроскопического исследования изучаемых органов отличий между группами и патологических признаков не выявлено.

Результаты морфометрического анализа свидетельствуют об отсутствии статистически значимых отличий в относительной массе внутренних органов у крыс при многократном применении препаратов в изученных дозах по сравнению с аналогичными показателями у контрольных животных (таблица 18).

Таблица 18 – Влияние препаратов «Экзазит» и «Хитазит»
на массу внутренних органов белых аутбредных крыс

Показатель	Группа животных, доза, мг/кг			
	Контроль	811	405	162
Экзазит				
Через 1 сутки после последнего введения				
Печень	11,3±0,68	11,4±0,76	11,4±0,71	11,4±1,13
Почки	1,31±0,28	1,51±0,15	1,44±0,16	1,63±0,25
Легкие	1,73±0,24	1,68±0,15	1,59±0,16	1,48±0,25
Селезенка	1,18±0,13	1,13±0,18	1,18±0,15	1,13±0,16
Сердце	0,89±0,07	0,91±0,09	0,93±0,05	0,92±0,12
Через 10 суток после последнего введения				
Печень	12,5±0,63	12,5±1,47	12,2±1,67	12,5±1,86
Почки	1,57±0,16	1,65±0,44	1,53±0,38	1,73±0,47
Легкие	1,88±0,36	1,77±0,45	1,69±0,56	1,59±0,65
Селезенка	1,29±0,29	1,19±0,26	1,28±0,27	1,27±0,34
Сердце	1,04±0,26	0,97±0,13	0,98±0,33	1,09±0,25
Показатель	Группа животных, доза, мг/кг			
	Контроль	770	385	154
Хитазит				
Через 1 сутки после последнего введения				
Печень	11,2±0,66	11,2±0,84	11,3±0,62	11,2±0,75
Почки	1,40±0,11	1,39±0,13	1,35±0,14	1,42±0,11
Легкие	1,60±0,33	1,58±0,20	1,61±0,23	1,57±0,34
Селезенка	1,17±0,18	1,16±0,17	1,19±0,17	1,19±0,19
Сердце	0,90±0,11	0,89±0,07	0,93±0,10	0,92±0,09
Через 10 суток после последнего введения				
Печень	12,1±1,11	12,3±1,36	12,4±1,26	12,3±1,45
Почки	1,61±0,16	1,66±0,44	1,60±0,38	1,59±0,47
Легкие	1,78±0,52	1,72±0,41	1,67±0,37	1,70±0,54
Селезенка	1,27±0,27	1,20±0,25	1,25±0,31	1,23±0,27
Сердце	1,87±0,40	0,84±0,24	0,90±0,42	1,76±0,33

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

Таким образом, в результате исследования субхронической пероральной токсичности разработанных препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц на белых аутбредных 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 аллергизирующих и раздражающих свойств препаратов «Экзазит» и «Хитазит» на морских свинках

Для изучения аллергического действия при пероральном введении препаратов были сформированы шесть опытных и шесть контрольных групп морских свинок массой 250–300 г ($n = 10$). Провели тестирование сенсibilизирующих свойств (конъюнктивальная, назальная пробы и НРДТК) сенсibilизированных животных на 10, 15 и 30-й день от начала введения препарата.

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 (рисунки 10–15).

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 (рисунки 16–21).

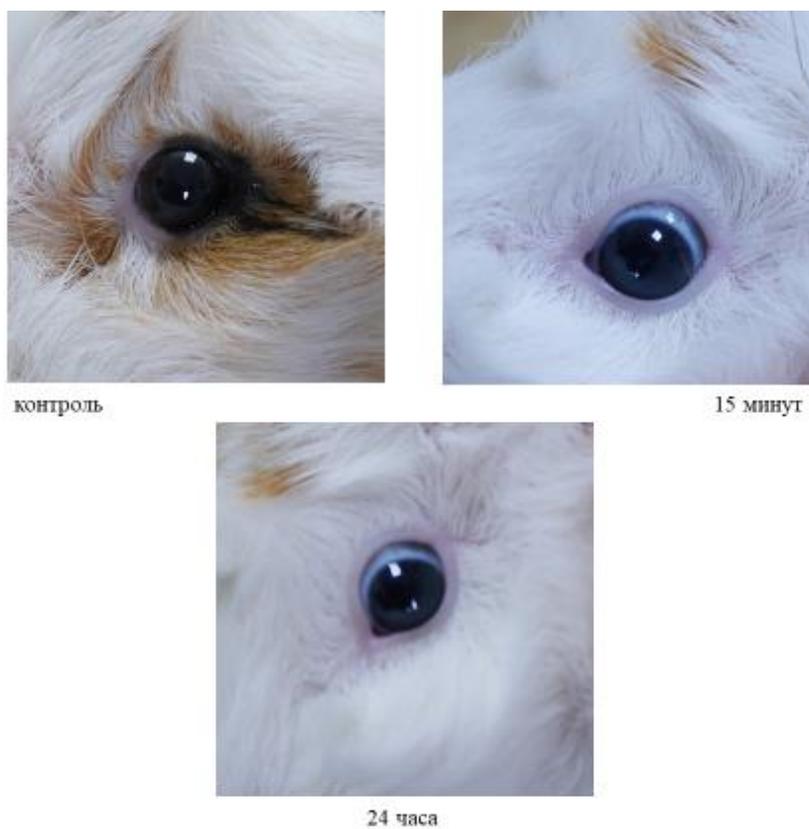


Рисунок 10 – Глаз морской свинки через 15 мин и 24 ч после инстилляции препарата «Экзазит» (10-е сутки)

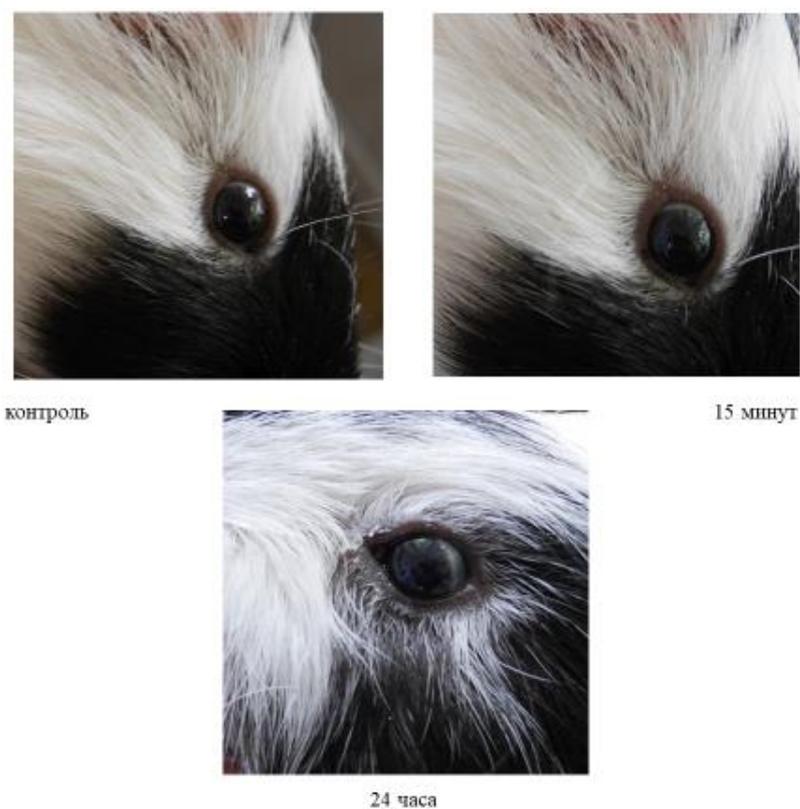


Рисунок 11 – Глаз морской свинки через 15 мин и 24 ч после инстилляции препарата «Экзазит» (15-е сутки)

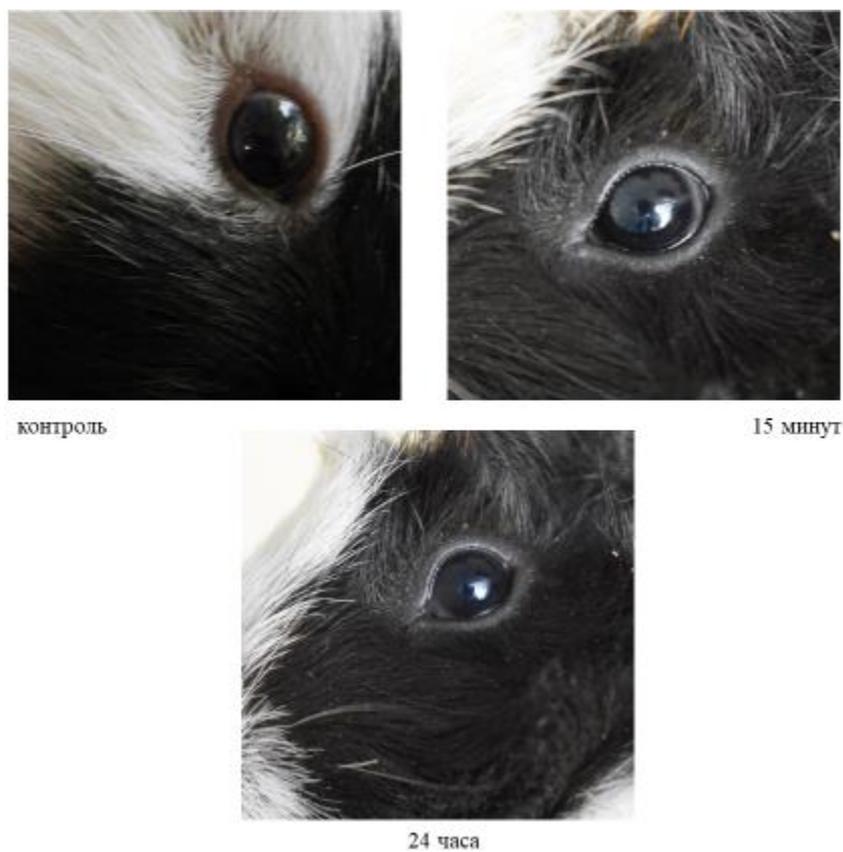


Рисунок 12 – Глаз морской свинки через 15 мин и 24 ч после инстилляции препарата «Экзазит» (30-е сутки)

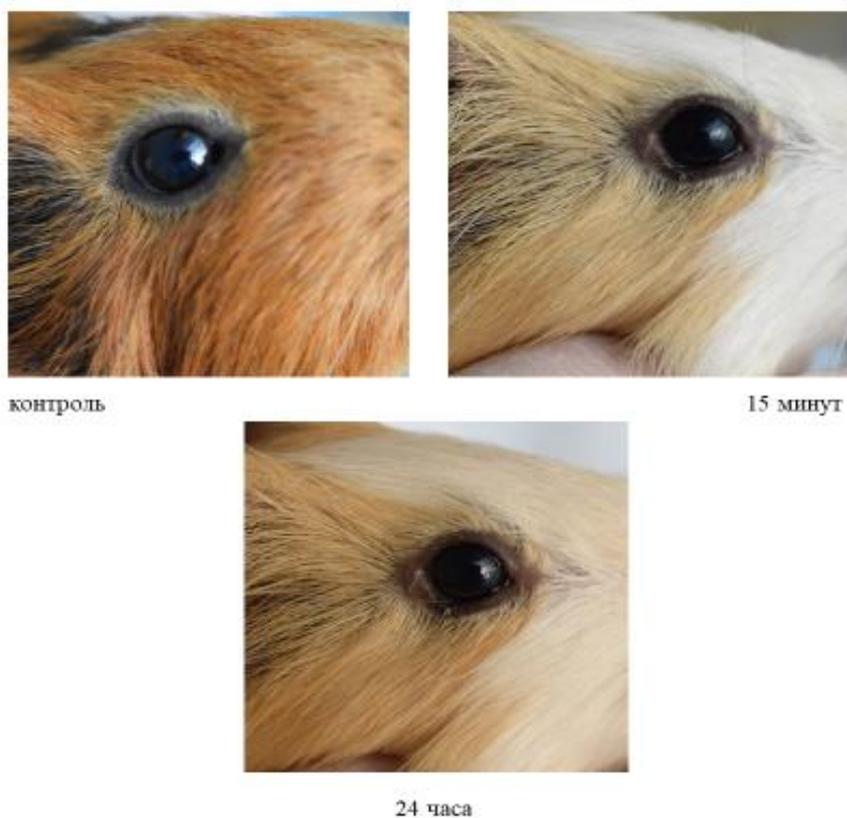


Рисунок 13 – Глаз морской свинки через 15 мин и 24 ч после инстилляции препарата «Хитазит» (10-е сутки)

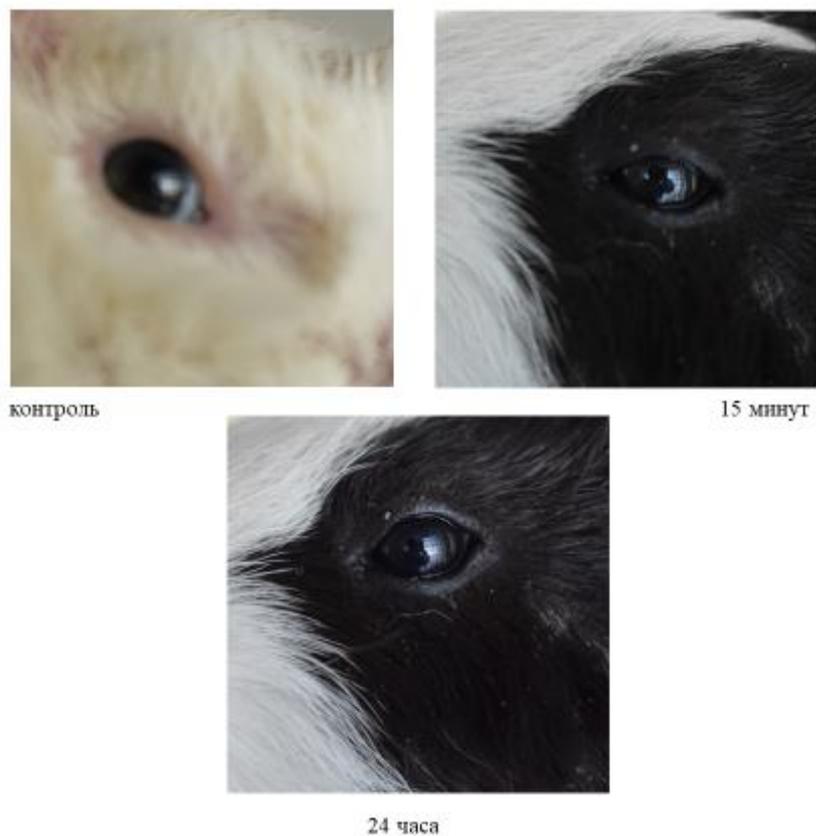


Рисунок 14 – Глаз морской свинки через 15 мин и 24 ч после инстилляци
препарата «Хитазит» (15-е сутки)

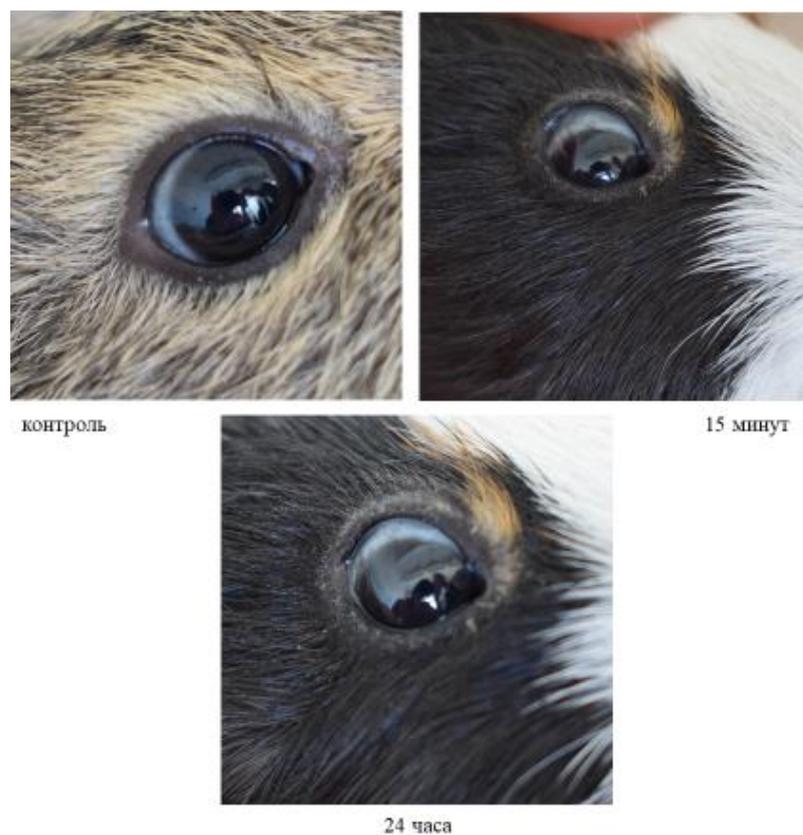


Рисунок 15 – Глаз морской свинки через 15 мин и 24 ч после инстилляци
препарата «Хитазит» (30-е сутки)



Рисунок 16 – Нос морской свинки через 15 мин и 24 ч после инстилляцией препарата «Экзазит» (10-е сутки)

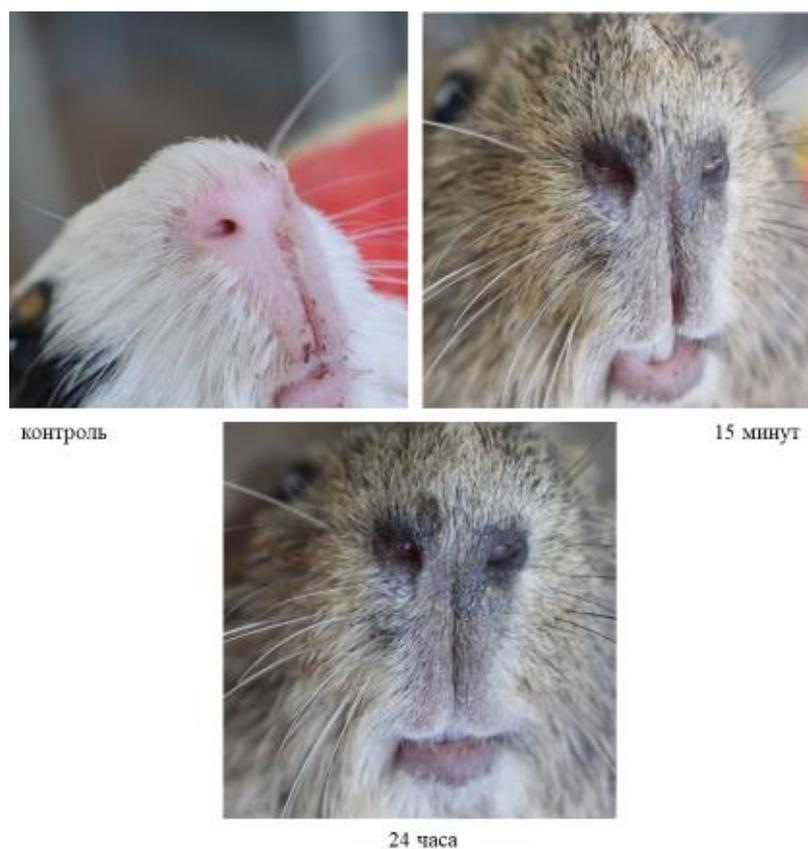


Рисунок 17 – Нос морской свинки через 15 мин и 24 ч после инстилляцией препарата «Экзазит» (15-е сутки)

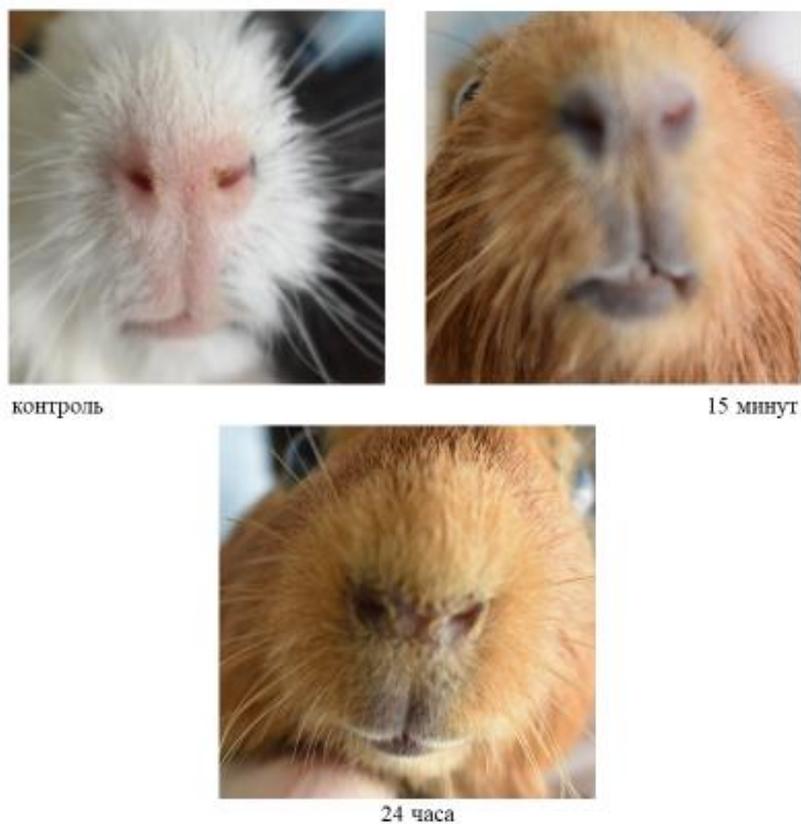


Рисунок 18 – Нос морской свинки через 15 мин и 24 ч после инстилляци
препарата «Экзазит» (30-е сутки)

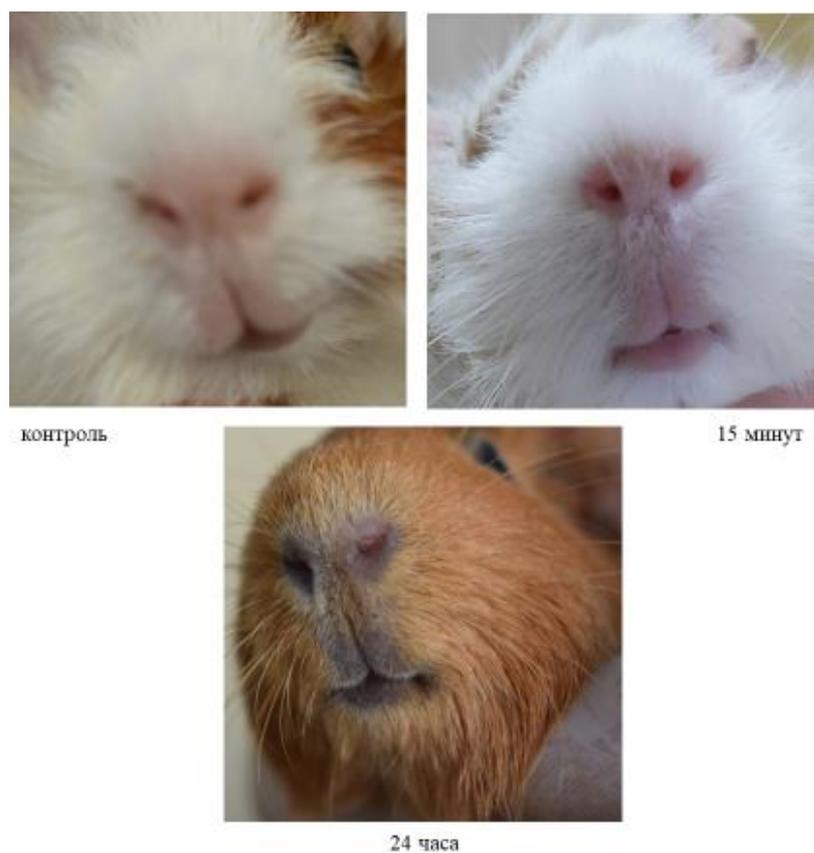


Рисунок 19 – Нос морской свинки через 15 мин и 24 ч после инстилляци
препарата «Хитазит» (10-е сутки)

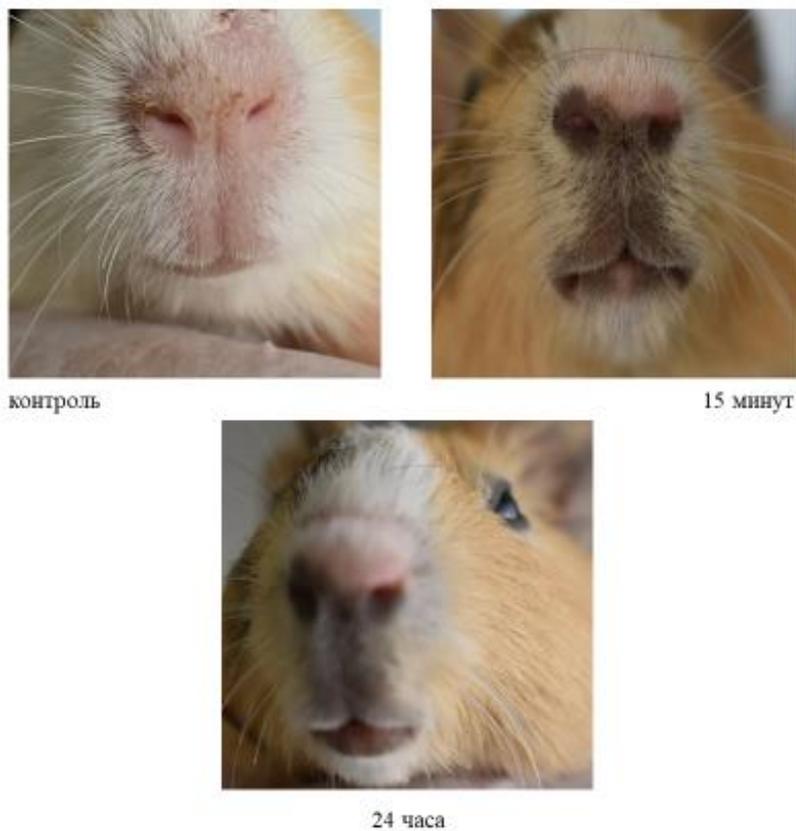


Рисунок 20 – Нос морской свинки через 15 мин и 24 ч после инстилляци
препарата «Хитазит» (15-е сутки)

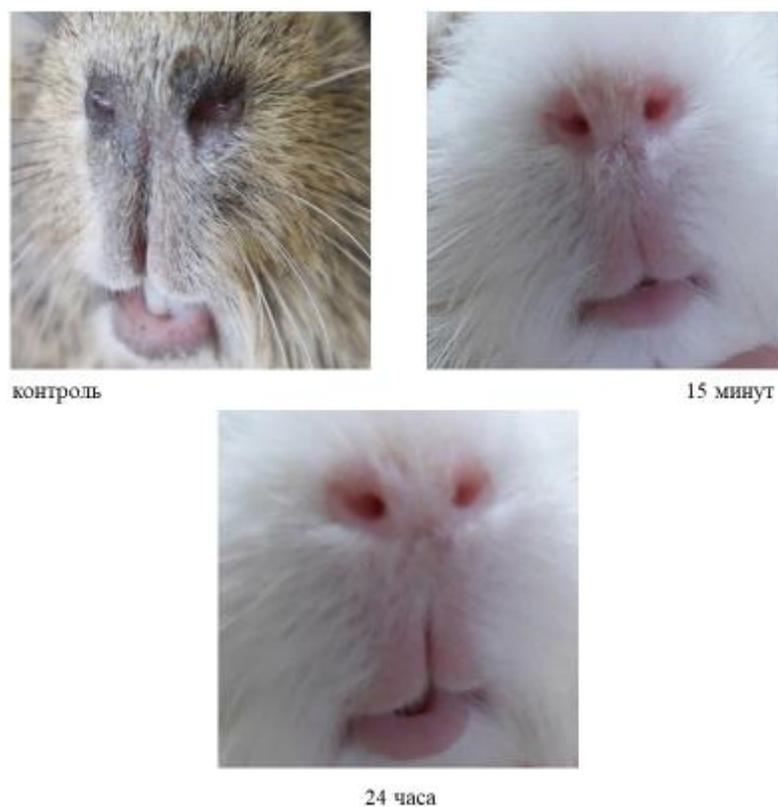


Рисунок 21 – Нос морской свинки через 15 мин и 24 ч после инстилляци
препарата «Хитазит» (30-е сутки)

В результате изучения НРДТК установили, что процент дегранулированных тучных клеток в опытных группах менее 10 (таблица 19). Таким образом, исследование сывороток крови опытных морских свинок после их сенсibilизации показало отсутствие алергизации организма у опытных животных всех групп.

Таблица 19 – Результаты реакции непрямо́й дегрануля́ции 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

Ученые E. C. Hort и W. J. Penfold еще в 1912 году впервые описали использование кроликов для оценки пирогенности (Virond C., 2016). Для изучения пирогенных свойств препаратов сформировано шесть опытных и две контрольные группы животных по три головы в каждой. Препараты вводили внутрибрюшинно, однократно. По окончании каждого из этапов испытания определяли максимальное изменение температуры (Dt) тела каждого кролика по сравнению с исходным значением. Для кроликов определяли

В результате изучения пирогенных свойств установили, что сумма повышений температуры у трех 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 апирогенными.

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

Для изучения сравнительной клинико-терапевтической эффективности препарата «Хитазит» сформировали три группы ягнят в возрасте 2,5–3,0 месяца ($n = 15$) с диагностированной острой катаральной бронхопневмонией. Диагноз подтверждался комплексно с учетом клинических и лабораторных исследований. На 7, 14 и 21-е сутки производили забор крови из яремной вены для морфо-биохимических исследований.

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 $41,2 \pm 0,9$ °C, 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 микробиальный 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–

11,7×10⁹/л. С целью лабораторного дифференцирования катаральной бронхопневмонии от крупозной изучили скорость свертывания крови (ССК), значение которой увеличивается при последней (таблица 22). При умеренном лейкоцитозе отмечали эозинофилию, вероятно связанную с сенсibiliзирующим действием микроорганизмов, а также нейтрофильный лейкоцитоз с регенеративным сдвигом ядра влево (таблица 23).

Таблица 22 – Гематологические показатели ягнят с диагностированной острой катаральной бронхопневмонией

№ группы	Эритроциты, 10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	СОЭ, мм/ч	ССК, мин
До лечения					
Норма	7–12	70–110	6–10	0,6–0,7	2–4
1	6,6±0,52	61,2±2,50	11,2±0,31	6,0±0,43	3,5±0,34
2	6,5±0,46	60,3±2,22	11,7±0,54	7,2±0,38	3,4±0,41
3	6,3±0,63	59,9±2,13	11,0±0,42	6,9±0,47	3,5±0,56
7-е сутки					
1	6,8±0,39	67,9±2,16	11,1±0,33	2,7±0,26	3,4±0,53
2	7,1±0,74*	73,6±2,28*	9,4±0,29*	0,7±0,73*	3,5±0,74
3	7,0±0,66*	73,5±2,53*	9,1±0,36*	0,7±0,85*	3,5±0,36
14-е сутки					
1	7,3±0,64	74,5±2,57	9,2±0,30	0,7±0,64	3,3±0,36
2	7,5±0,27	76,2±2,53	7,3±0,43*	0,7±0,53	3,4±0,29
3	7,5±0,86	76,7±2,59	7,1±0,21*	0,7±0,63	3,3±0,66
21-е сутки					
1	7,8±0,30	78,0±2,21	7,6±0,44	0,6±0,64	3,4±0,63
2	7,7±0,64	76,7±2,55	7,5±0,54	0,6±0,53	3,3±0,39
3	7,9±0,73	78,8±2,31	7,6±0,71	0,6±0,64	3,5±0,23

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

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 (таблица 24).

Таблица 23 – Лейкоцитарная формула крови ягнят при острой катаральной бронхопневмонии, %

№ группы	Гранулоциты					Агранулоциты		ИЯСН
	Базофилы	Эозинофилы	Нейтрофилы			Лимфоциты	Моноциты	
			Юные	Палочкоядерные	Сегментоядерные			
До лечения								
Норма	0–1	1–4	0–2	2–4	40–48	40–50	2–6	0,05–0,1
1	0,7±0,07	6,1±0,45	3,7±0,07	10,7±0,07	32,2±0,71	42,9±0,91	5,7±0,39	0,45±0,02
2	0,5±0,03*	6,1±0,34	3,7±0,06	10,7±0,04	32,4±0,85	43,1±0,85	5,5±0,21	0,44±0,03
3	0,7±0,05	6,0±0,58	3,7±0,03	10,7±0,06	32,8±0,75	44,5±0,76	5,6±0,27	0,44±0,02
7-е сутки								
1	0,6±0,05	3,1±0,42	2,5±0,06	4,4±0,07	33,2±0,80	49,6±2,91	6,4±0,45	0,31±0,02
2	0,6±0,04	2,2±0,21*	1,3±0,07*	2,9±0,05*	35,1±0,73*	51,3±1,85*	6,2±0,39	0,20±0,04*
3	0,6±0,05*	1,1±0,24*	1,2±0,05*	2,1±0,07*	36,3±0,70*	52,1±2,76*	6,0±0,20	0,14±0,03*
14-е сутки								
1	0,6±0,06	1,9±0,43	2,8±0,08	4,1±0,08	36,7±2,05	50,2±3,91	4,0±0,21	0,26±0,03
2	0,6±0,04	1,2±0,35	1,1±0,07*	3,5±0,06*	44,1±1,83*	43,4±2,85*	4,6±0,24*	0,15±0,03
3	0,6±0,08	1,0±0,57	1,1±0,07*	3,1±0,08*	45,4±1,31*	44,0±2,76*	4,1±0,19*	0,13±0,04
21-е сутки								
1	0,6±0,02	1,6±0,37	1,9±0,03	3,6±0,05	42,3±0,65	45,6±3,37	3,4±0,32	0,18±0,02
2	0,6±0,05	1,3±0,36	1,6±0,05*	2,9±0,05*	46,2±0,78	43,7±3,63	2,6±0,22	0,13±0,02
3	0,6±0,06	1,4±0,56	1,2±0,06*	2,9±0,06*	45,0±0,81	45,0±2,74	2,8±0,38	0,12±0,03

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

Таблица 24 – Биохимическая картина крови ягнят с диагностированной острой катаральной бронхопневмонией

Показатель	Норма	Группа		
		1	2	3
До лечения				
Общий белок, г/л	60–75	85,53±11,43	85,25±13,38	86,53±12,40
Белковые фракции (%):				
Альбумины	35–50	24,52±1,10	25,40±1,05	25,66±1,50
α-глобулины	13–20	13,64±0,66	13,42±0,79	14,47±0,76
β-глобулины	7–11	7,36±0,35	7,80±0,41	7,24±0,45
γ-глобулины	20–46	54,48±12,35	53,38±13,42	52,63±12,51
Кальций, ммоль/л	2,5–3,2	2,21±0,03	2,18±0,02	2,20±0,03
Фосфор, ммоль/л	1,45–1,84	1,67±0,18	1,54±0,19	1,61±0,11
Щелочной резерв, мг %	460–520	244,73±36,84	240,42±32,94	242,38±37,84
7-е сутки				
Общий белок, г/л	60–75	83,64±2,67	77,34±2,30*	73,53±2,29*
Белковые фракции (%):				
Альбумины	35–50	24,73±1,12	30,45±0,90*	29,35±0,77*
α-глобулины	13–20	13,27±0,67	13,37±0,83	14,73±0,76
β-глобулины	7–11	7,22±0,41	7,47±0,45	7,65±0,48
γ-глобулины	20–46	53,78±2,97	47,71±2,42*	46,27±2,48*
Кальций, ммоль/л	2,5–3,2	2,22±0,02	2,22±0,04	2,24±0,03
Фосфор, ммоль/л	1,45–1,84	1,67±0,15	1,54±0,15	1,61±0,12
Щелочной резерв, мг %	460–520	322,63±30,72	398,35±32,74*	392,70±35,37*
14-е сутки				
Общий белок, г/л	60–75	78,45±3,02	71,05±2,34*	69,47±3,11*
Белковые фракции (%):				
Альбумины	35–50	28,22±3,93	37,43±2,87*	38,74±3,90*
α-глобулины	13–20	13,78±0,74	13,57±0,99	13,26±1,01
β-глобулины	7–11	7,63±0,47	7,74±0,33	7,85±0,45
γ-глобулины	20–46	48,37±2,98	40,26±2,63*	37,15±3,49*
Кальций, ммоль/л	2,5–3,2	2,29±0,02	2,33±0,05*	2,34±0,03*
Фосфор, ммоль/л	1,45–1,84	1,68±0,16	1,55±0,15	1,62±0,13
Щелочной резерв, мг %	460–520	396,14±31,94	479,35±26,53*	473,33±29,64*
21-е сутки				
Общий белок, г/л	60–75	74,75±3,39	65,42±2,70*	63,35±4,54*
Белковые фракции (%):				
Альбумины	35–50	33,13±3,84	42,64±3,33*	43,34±3,98*
α-глобулины	13–20	13,46±0,50	13,20±0,84	15,90±0,54
β-глобулины	7–11	7,54±0,85	7,43±0,42	7,42±0,25
γ-глобулины	20–46	44,87±3,85	34,73±2,42*	32,34±3,55*
Кальций, ммоль/л	2,5–3,2	2,51±0,03	2,60±0,06*	2,62±0,05*
Фосфор, ммоль/л	1,45–1,84	1,69±0,16	1,56±0,15	1,64±0,14
Щелочной резерв, мг %	460–520	452,65±28,67	502,60±23,81*	511,75±30,43*

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

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 вышеперечисленное 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 эксудата, 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 эндovasкулита, 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 сенсibilизации 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, зерни-

стой массой с десквамацией эпителия и гомогенизацией мышечной оболочки. Единичные малые бронхи без выраженных патологических процессов (рисунки 22, 23).

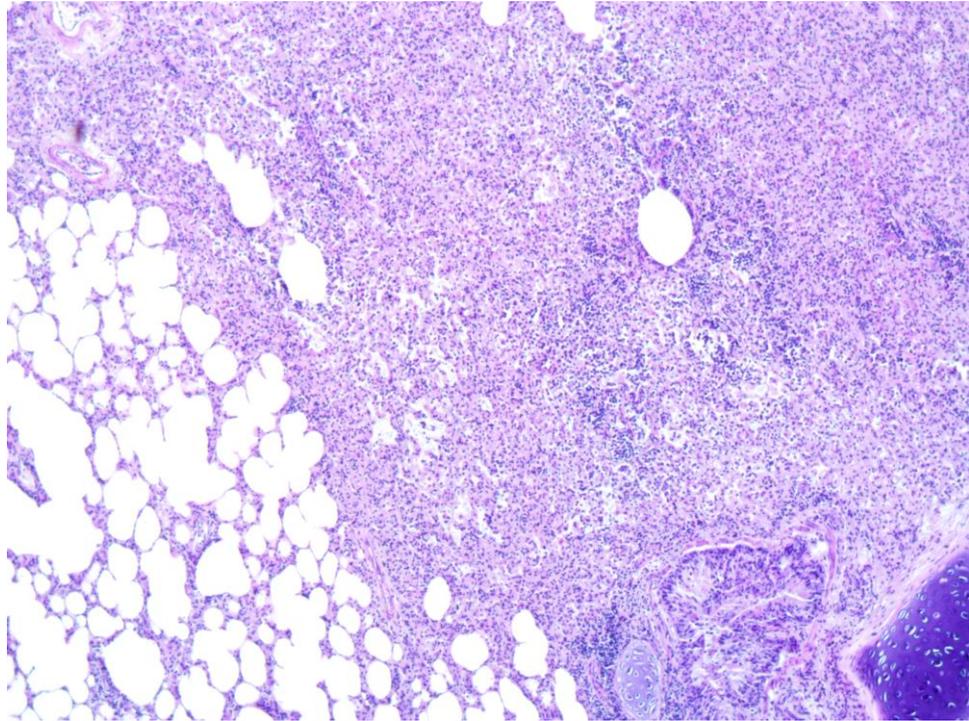


Рисунок 22 – Микроскопическое строение легких до лечения. Очаг серозной пневмонии. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. X100

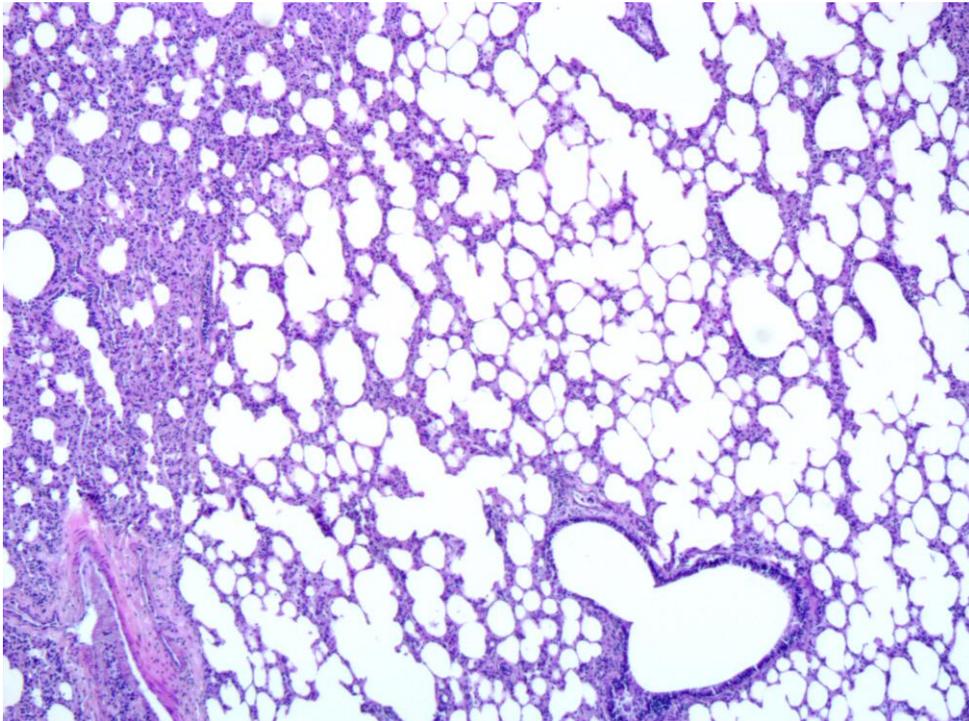


Рисунок 23 – Микроскопическое строение легких до лечения. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. X200

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. По отчетам Европейского общества антимикробной химиотерапии (European society of antimicrobial chemotherapy, ESAC), макролиды занимают второе место по объему потребления среди антибиотиков, применяющихся в амбулаторной практике, уступая только пенициллинам (Ferech M. et al., 2006).

При антибактериальной терапии препараты вводили внутримышечно согласно схеме, представленной в таблице 25.

Таблица 25 – Схема лечения молодняка мелкого рогатого скота с диагностированной острой бронхопневмонией

Показатель	Группа 1 (контроль)	Группа 2	Группа 3
	Азитронит 10 %	Экзазит – 5 %	Хитазит – 5 %
Доза, мл/10кг	0,5	0,5	0,5
Расход действующего вещества на курс, мг/10кг	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, вези-

кулярным, 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 (см. таблицу 22). 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 (см. таблицу 23). 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 (см. таблицу 22). В контрольной группе количество нейтрофилов и ИЯСН

как на 7-е, так и на 14-е сутки превышало референсные значения (см. таблицу 23).

При терапии острой бронхопневмонии ягнят препаратами «Экказит» 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.

На 21-е сутки исследуемые морфологические показатели крови в опытной и контрольной группе находились в пределах референсных значений.

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 (см. таблицу 24).

На 21-е сутки исследуемые биохимические показатели крови в опытной и контрольной группе находились в пределах референсных значений (см. таблицу 25).

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 (рисунки 24, 25).

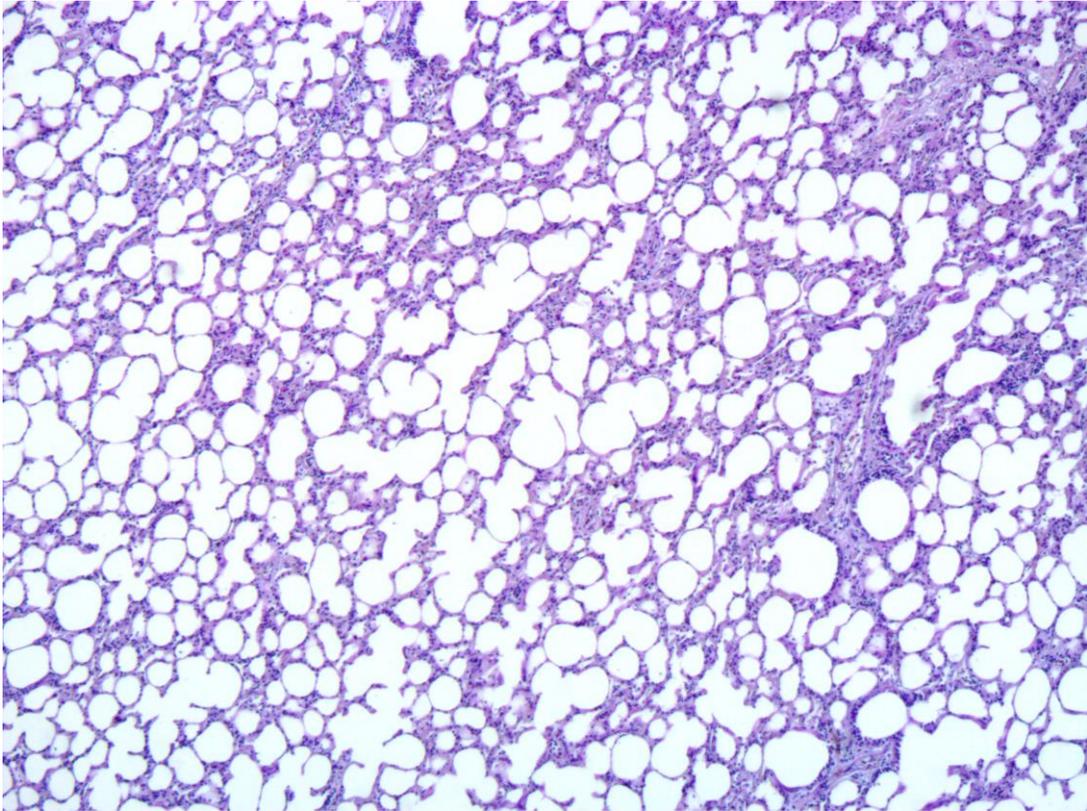


Рисунок 24 – Микроскопическое строение легких после курса комплексной терапии с препаратом «Азитронит» (группа 1). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100

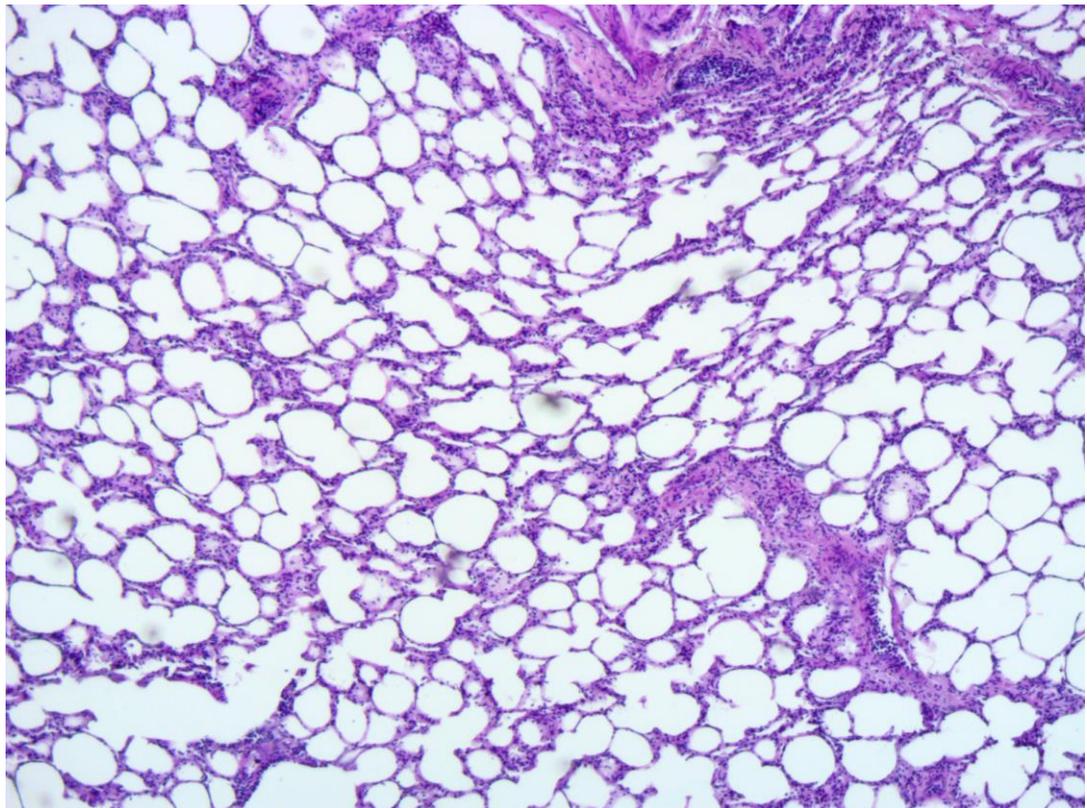


Рисунок 25 – Микроскопическое строение легких после курса комплексной терапии с препаратом «Азитронит» (группа 1). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200

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 сохраняется 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 (рисунки 26, 27).

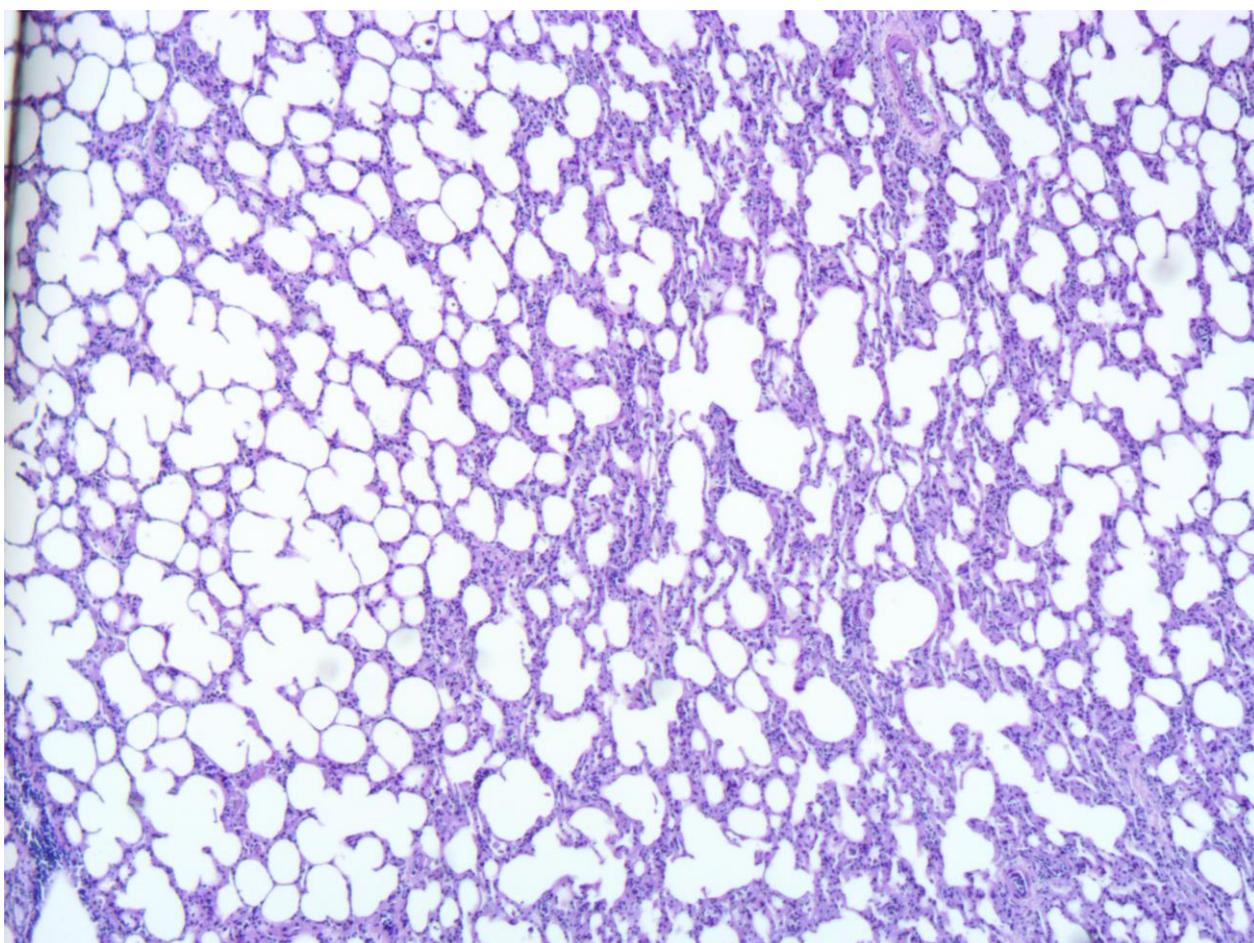


Рисунок 26 – Микроскопическое строение легких после курса комплексной терапии с препаратом «Экзазит» (группа 2). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100

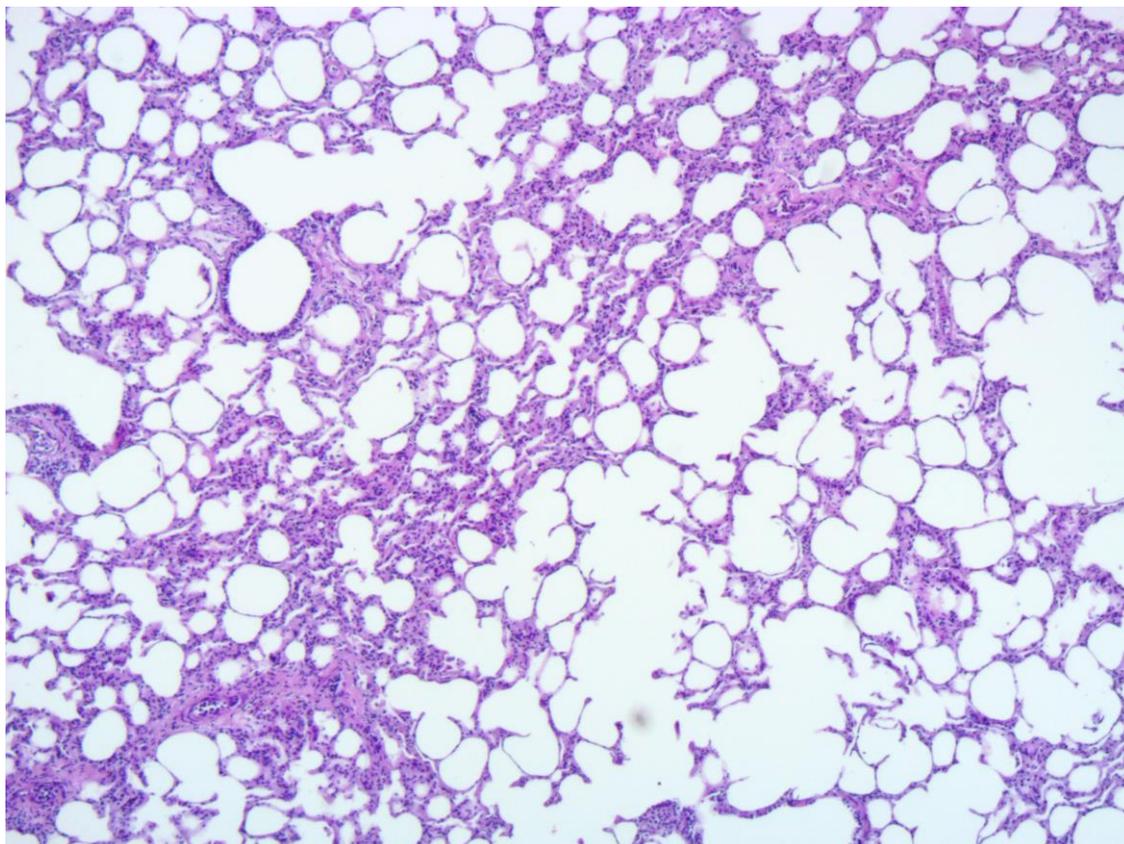


Рисунок 27 – Микроскопическое строение легких после курса комплексной терапии с препаратом «Экзазит» (группа 2). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200

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 сенсibiliзацию и иммунизацию организма. В единичных сосудах микроциркуляторного кровеносного русла еще просматриваются очаги эндовакулита с редкими очаговыми лимфоцитарными инфильтратами вокруг сосудов микроциркуляторного русла (артериол, венул) (рисунки 28, 29).

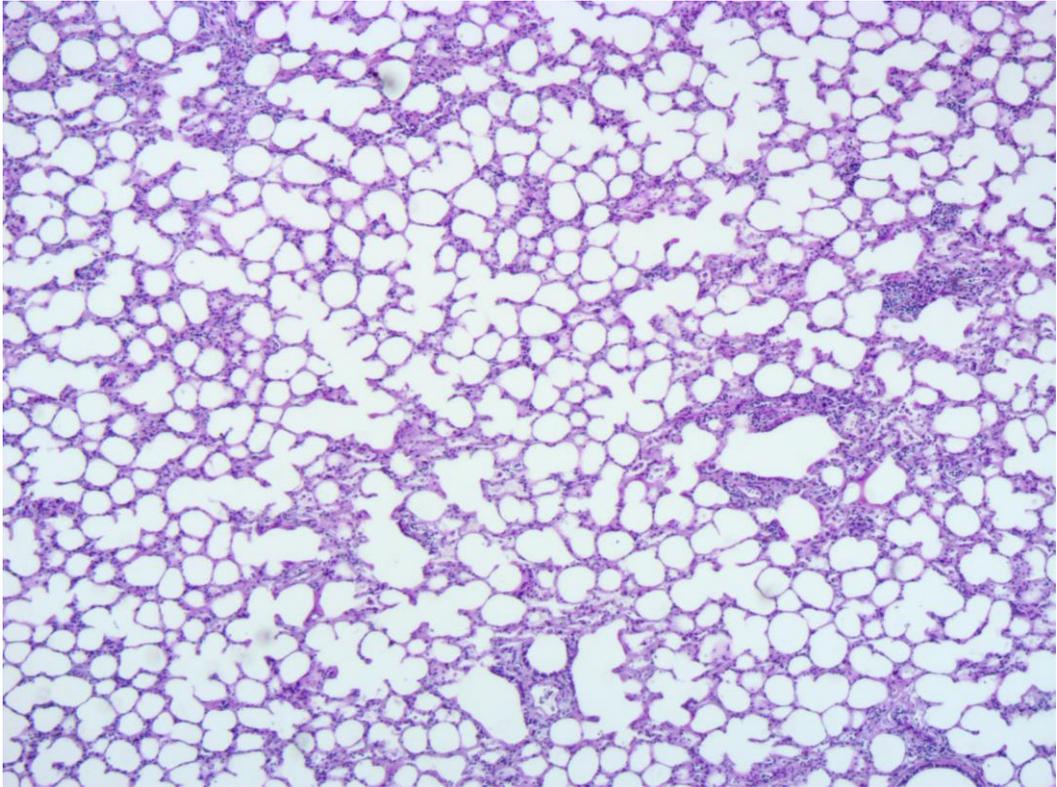


Рисунок 28 – Микроскопическое строение легких после курса комплексной терапии с препаратом «Хитазит» (группа 3). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100

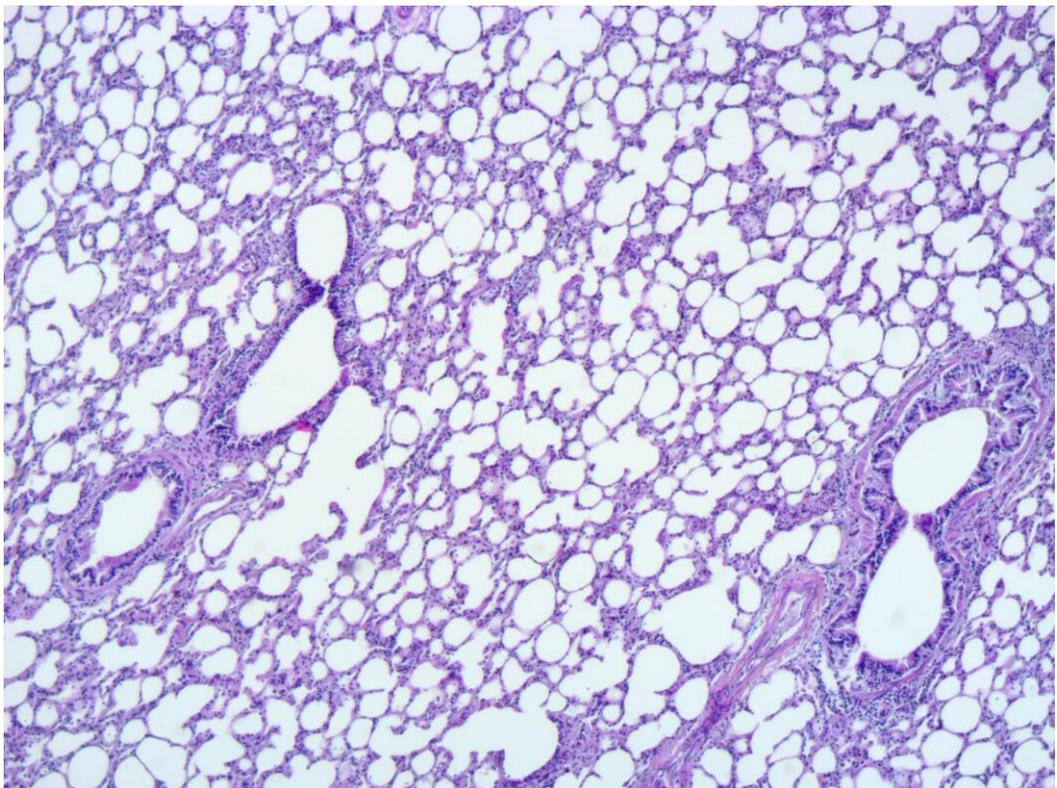


Рисунок 29 – Микроскопическое строение легких после курса комплексной терапии с препаратом «Хитазит» (группа 3). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100

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 (см. рисунки 24, 25).

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. Морфобиохимическая 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 изучении 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 разработки новых лекарственных препаратов во многом связан с получением принципиально новых лекарственных форм. В данном аспекте биофармацевтические исследования по созданию лекарств нового поколения приобретают особую актуальность. Одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений является разработка лекарственных форм с выраженным селективным действием. Интенсивные исследования в данной области в первую очередь обусловлены возможностями получения транспортных систем для направленной доставки лекарственных веществ в организме, что является давней целью фармакологии. Очевидно, что для решения таких задач необходим некий носитель с оптимальными свойствами, который мог бы избирательно доставлять лекарственные вещества в патологический очаг.

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 биодеструктурируются организмом (Batrakova E. V. et al., 2003; Кулакова И. И. с соавт., 2018; Chan Н. К., 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 – скорость удаления из зоны введения и из крови, распределение и перераспределение в органах и тканях, эффективность доставки к определенным патологическим очагам (Batrakova E. V. et al., 2010).

ВСС Research установлено, что мировой рынок экзосомной диагностики и терапии в 2016 и 2018 годах составлял \$16,1 и \$34,7 млн соответственно, по прогнозам, к 2021 году он вырастет до \$111,8 млн, а к 2023 году до \$186,2 млн, что соответствует совокупному годовому темпу роста в 47,3 %. При этом глобальный рынок для индустрии экзосом к 2023 году должен достичь \$180,0 млн (в 2018 году он составлял \$25 млн) при совокупном годо-

вом темпе роста в период 2018–2023 годов 48,4 %. Глобальный рынок хитина и хитозана в 2016 году равнялся \$2,0 млрд, а к 2021 году должен достичь \$4,2 млрд при совокупном годовом темпе роста 15,4 %. Согласно BCC Research, общемировой доход от внедрения систем доставки лекарственных средств в 2018 году составил в \$212,8 млрд долл. США, демонстрируя совокупный годовой темп роста 3,2 %. Согласно подтвержденным исследованиям рынка, опубликованным BCC Research в августе 2019 года, глобальный рынок систем селективной доставки легочных лекарств был оценен в 39,97 млрд долл. США в 2018 году и, по прогнозам, достигнет 58,07 млрд долл. США к 2026 году, увеличившись в среднем на 4,8 % с 2019 по 2026 год (<https://www.bccresearch.com/market-research/pharmaceuticals/advanced-drug-delivery-systems-tech-markets-report.html>). Вышеперечисленное служит свидетельством актуальности использования экзосом и хитозана в качестве основы для разработки препаратов с выраженной селективностью. Исходя из этого целью нашего исследования была разработка селективных препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц, проведение сравнительной оценки клинко-терапевтической эффективности препарата на основе хитозановых частиц при бронхопневмонии ягнят.

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 (Allan D. et al., 1980; Looze C., Yui D., Leung L. et al., 2009; Пат. RU 2556825). Наиболее широкое применение у исследователей получил протокол изоляции экзосом, который включает ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы (Théry C. et al., 2006). Проведенные исследования согласуются с данными ведущих ученых, нами разработаны два способа извлечения экзосом из крови, методом ультрацентрифугирования и ультрафильтрации. При этом метод ультрафильтрации выигрывает по длительности, комфортности и трудоемкости.

Нами 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.

Установлено, что процесс выхода азитромицина из диализного мешка наиболее интенсивно происходит в средах с низким рН. Так, в кислых растворах происходит высвобождение 50 % препарата за первые 24 ч, тогда как при диализе в нейтральном растворе происходит высвобождение 30 % препарата, что подтверждает литературные данные о рН-чувствительности хитозана.

Согласно зарубежным источникам, при правильном подборе направляющего агента возможно контролируемое изменение кинетики действующего вещества (Cánepa C. et al., 2017; Huang G. et al., 2017; Foda N. H. et al., 2007; Dhanaraj S. A. et al., 2014). Проведенные фармакокинетические исследования подтверждают это. Установлено, что разработанные препараты «Экзазит» и «Хитазит» обладают селективностью к легочной ткани. При снижении концентрации препаратов «Экзазит» и «Хитазит» в плазме крови происходило одновременное повышение концентрации в легочной ткани. Терапевтическая концентрация антибиотика сохраняется в течение 14 суток и не требует введения новых доз препарата в организм извне, что и предопределяет возможность однократного введения препаратов при антибактериальной терапии. При этом спустя 14 суток после последнего введения препаратов «Экзазит» и «Хитазит» их внутрилегочная концентрация составляет 0,823 и 5,823 мкг/г, что превышает МПК₉₀ для патогенов (в частности МПК₉₀ *S. pneumoniae* составляет 0,12 мкг/мл). Фармакокинетическими исследованиями, проведенными на белых мышах, установлено, что при введении препаратов «Экзазит» и «Хитазит» максимальная концентрация антибиотика в легочной ткани превышает плазменные в 70 и 91 раз соответственно.

При изучении острой и хронической токсичности Zhu et al. (2017) установили, что многократное введение экзосомальных частиц в организм

мышей не вызывает визуальных признаков токсичности, статистических различий в массе тела, изменений общего анализа и биохимии крови, а также гистопатологических изменений тканей (тимус, сердце, легкие, печень, селезенка, почки, надпочечники, яичники, матка, мозг), что указывает на отсутствие токсичности экзосом. Результаты исследований подтверждают, что пациенты хорошо переносили повторные введения аутологичных экзосом в течение 21 месяца (Escudier B. et al., 2005).

Проведенные нами исследования подтверждают выводы многих авторов об отсутствии токсических свойств у экзосомальных частиц. Так, при определении острой пероральной токсичности препарата «Экзазит» установлено, что LD_{50} при внутрижелудочном введении препарата для белых мышей и крыс составляет $7537 \pm 56,76$ и $8112 \pm 59,99$ мг/кг соответственно. 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».

Хитозан известен как нетоксичный полимер и одобрен FDA для тканевой инженерии, доставки лекарств, наружного применения как компонент раневых покрытий (Wedmore I. et al., 2006).

Результаты наших исследований подтверждают отсутствие токсических свойств у хитозана. Так, при определении острой пероральной токсичности препарата «Хитазит» установлено, что LD_{50} при внутрижелудочном введении препарата «Хитазит» для белых мышей и крыс составляет $6982 \pm 170,94$ и $7705 \pm 165,16$ мг/кг соответственно. 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».

В результате исследования субхронической пероральной токсичности разработанных препаратов на основе экзосомальных и хитозановых частиц на белых аутбредных 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 препарата.

При введении пациентам с клеточной карциномой легкого аутологичных экзосом еженедельно в течение 4 недель, наблюдались низкие уровни иммунных ответов (Morse M. A. et al., 2005). Ряд исследователей (Custódio et al., 2010; Isikli et al., 2012) в своих публикациях говорят о гипоаллергенных свойствах хитозана, чем аргументируют его использование в тканевой инженерии.

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

Многие авторы в своих публикациях рассматривают хитозан как биополимерную матрицу для направленной доставки лекарственных веществ с пролонгированным высвобождением путем их медленной диффузии (Quiñones J. P. et al., 2018; Wang J. et al., 2017; Cánepa C. et al., 2017; Huang G. et al., 2017; Foda N. H. et al., 2007; Dhanaraj S. A. et al., 2014; Makhlof A. et al., 2011; Chavana C. et al., 2017).

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. Морфобиохимическая 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 («Экказит») с размером частиц $91,36 \pm 15,3$ нм и степенью включения действующего вещества 77,4 % и на основе хитозана («Хитазит») с размером частиц $100,41 \pm 50,64$ нм и степенью включения действующего вещества 86,6 %.

2. Препарат «Экказит» согласно ГОСТ 12.1.007–76 по среднесмертельной пероральной дозе относится к 4-му классу опасности – «Вещества малоопасные». LD_{50} при внутрижелудочном введении экказита для белых мышей и крыс составила $7537 \pm 56,76$ и $8112 \pm 59,99$ 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». LD_{50} при внутрижелудочном введении Экказита для белых мышей и крыс составила $6982 \pm 170,94$ и $7705 \pm 165,16$ 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. Экказит 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. Экказит и хитазит являются апирогенными в связи с тем, что сумма повышений температуры после внутрибрюшинного введения лекарственных препаратов составила $0,6\text{--}0,8$ °С, а индивидуальное повышение температуры не превышало $0,5$ °С.

6. Экказит и хитазит не обладают аллергенным и раздражающим действием на конъюнктиву глаза и слизистые оболочки, процент дегранули-

рованных 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- Т – температура
- ЧД – частота дыхания
- ЧСС – частота сердечных сокращений
- СОЭ – скорость оседания эритроцитов
- ССК – скорость свертывания крови
- КЩР – кислотно-щелочное равновесие
- ИЯСН – индекс ядерного сдвига нейтрофилов
- ЛД – летальная доза
- АСТ – аспартатаминотрансфераза
- АЛТ – аланинаминотрансфераза
- ЩФ – щелочная фосфатаза
- НРДТК – неспецифическая дегрануляция тучных клеток
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- ПДК – процент дегранулированных тучных клеток
- МПД – минимальная переносимая доза
- LD – летальная доза
- SLD₅₀ – отклонение средней летальной дозы
- МПК – минимальная подавляющая концентрация
- FDA - Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов, США
- КТ – квантовые точки
- ММ – молекулярная масса
- СД – степень деацетилирования

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологически активные вещества (хитозан и его производные) / А. Я. Самуйленко, С. А. Гринь, А. И. Албулов и др. – 2018. – 329 с.
2. Биостимулятор на основе низкомолекулярного хитозана из панциря раков для предпосевной обработки семян томатов / Ш. Б. Байрамбеков, Е. В. Полякова, М. Д. Мукатова, А. Киричко // Вестник АГТУ. Сер. : Рыбное хозяйство. – 2012. – № 1. – С. 181–184.
3. Васильев, Ю. Г. Ветеринарная клиническая гематология : учебное пособие / Ю. Г. Васильев, Е. И. Трошин, А. И. Любимов. – СПб. : Лань, 2015. – 656 с. (+ DVD).
4. Ветеринарно-санитарная оценка продуктов убоя утят при применении хитозана / Г. М. Топурия, Л. Ю. Топурия, В. П. Корелин, М. Б. Ребезов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2014. – № 3. – С. 95–97.
5. ГОСТ 12.1.007–76 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями № 1, 2). – М. : Стандартинформ, 2007. – 7 с.
6. ГОСТ 32296–2013 Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы. – М. : Стандартинформ, 2004. – 16 с.
7. ГОСТ 32419–2013 Классификация опасности химической продукции. Общие требования. – М. : Стандартинформ, 2004. – 28 с.
8. ГОСТ 32644–2014 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности. – М. : Стандартинформ, 2015. – 15 с.
9. ГОСТ 33044–2014 Принципы надлежащей лабораторной практики. – М. : Стандартинформ, 2015. – 16 с.

10. 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.
11. 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.
12. 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. – №7. – Том 15. – С. 999-1006. – [https://doi: 10.35679/1991-9476-2020-15-7-999-1006](https://doi.org/10.35679/1991-9476-2020-15-7-999-1006).
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. Преимущество экзосом в качестве векторов лекарственных средств / Е. С. Кастарнова // Молодые аграрии Ставрополя : сб. студенческих научных трудов по материалам 81-й научно-практической конференции. – Ставрополь : АГРУС, 2016. – С. 32–33.
15. 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.
16. 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. – Т. 2. – С. 228–230.

17. Каширина, Е. И. Разработка системы гипоаллергенной упаковки белков в полимерный матрикс : дис. ... канд. хим. наук / Каширина Е. И. – 2017.
18. Лакин, Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высшая школа, 1990.
19. Мейер, Д. Ветеринарная лабораторная медицина. Интерпретация и диагностика / Д. Мейер, Д. Харви. – М. : Софион, 2007. – 456 с.
20. Методологические основы оценки клинико-морфологических показателей крови домашних животных : учебное пособие / Е. Б. Бажибина, А. В. Коробов, С. В. Серeda, В. П. Сапрыкин. – М. : ООО «Аквариум-Принт», 2007. – 128 с. : ил.
21. Механизм действия хитозана при индуцировании устойчивости картофеля / Н. И. Васюкова, Я. С. Панина, Г. И. Челенко и др. // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана : материалы Восьмой Международной конференции. – М. : ВНИРО, 2006. – С. 321–323.
22. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. / А. Н. Миронов. – М. : Гриф и К, 2012. – 944 с.
23. Наглядная гематология ; пер. с англ. / под ред. В. И. Ершова. – 2-е изд. – М. : ГОЭТАР-Медиа, 2008. – 115 с.
24. Направленный транспорт лекарственных средств: от идеи до внедрения : учебно-методическое пособие / И. И. Кулакова и др. ; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – Рязань : ОТС и ОП, 2018. – 104 с.
25. Некрасова, И. И. Гематология : учебное пособие / И. И. Некрасова, А. Н. Квочко, Р. А. Цыганский. – Ставрополь : ООО «Респект», 2015. – 168 с.
26. Новые достижения в исследовании хитина и хитозана : материалы VI Международной конференции. – М. : ВНИРО, 2001. – 398 с.
27. Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана : материалы Девятой Международной конференции / А. В. Бакулин, А. А. Львова, А. И. Албулов, Дин Тоай Тран. – М. : ВНИРО, 2008. – С. 241–243.

28. Определение физико-химических параметров наночастиц модифицированного хитозана / А. А. Зубарева, Д. В. Курек, С. В. Сизова и др. // Российские нанотехнологии. – 2012. – Т. 7. – № 7–8. – С. 102–106.

29. 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.

30. 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.

31. 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.

32. 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.

33. 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.

34. Пат. RU 2556825, МПК. С12N5/00 (2006.01) ; опубл. 20.07.2015.

35. Перспективы использования экзосом опухолевых клеток в диагностике, мониторинге и терапии злокачественных заболеваний / М. В. Тихонова, А. И. Карачунский, В. И. Пospelов и др. // Российский журнал детской гематологии и онкологии. – № 2. – Т. 4. – 2017. – С. 40–45.

36. Плохинский, Н. А. Математические методы в биологии / Н. А. Плохинский. – М. : Изд-во Московского ун-та, 1978.
37. Получение и анализ экзосом, секретируемых злокачественно трансформированными клетками человека в системах *in vitro* / Т. А. Штамм, С. Н. Нарыжный, С. Б. Ланда и др. // Цитология. – 2012. – Т. 54. – № 5. – С. 430–438.
38. Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных. – Режим доступа: <https://www.begalacts.ru/>
39. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». – Режим доступа: <https://www.begalacts.ru/>
40. Приказ Минсельхоза России № 101 от 06.03.2018 «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».
41. Рашидова, С. Ш. Влияние полимерных препаратов на основе производных полисахаридов на патогенные микроорганизмы / С. Ш. Рашидова, Р. Ю. Милушева // Доклады Академии наук Республики Узбекистан. – 2009. – № 3–4. – С. 80–82.
42. Риган, В. Д. Атлас ветеринарной гематологии / В. Д. Риган, Т. Г. Сандерс, Д. Б. Деникола ; пер. с англ. Е. Махиянова. – М. : Аквариум-Принт, 2008. – 136 с. : ил.
43. Сафронова, Т. М. Применение хитозана в производстве пищевых продуктов / Т. М. Сафронова // Хитин и хитозан. Получение, свойства, применение. – М. : Наука, 2002. – С. 346–359.
44. Свирцевская, Е. В. Наноносители лекарств на основе хитозана / Е. В. Свирцевская, Р. С. Гриневич, П. Д. Решетов и др. // Биотехносфера. – 2012. – Т. 19. – № 1. – С. 13–20.

45. Свирщевская, Е. В. Характеристика систем доставки вакцин и лекарств на основе наночастиц N-гексаноил-хитозана / Е. В. Свирщевская, А. А. Зубарева, Р. С. Гриневич и др. // Современные вопросы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. – 2011. – Т. 19. – № 6. – С. 21–28.
46. Сивкова, Т. Н. Клиническая ветеринарная гематология : учебное пособие / Т. Н. Сивкова, Е. А. Доронин-Доргелинский ; М-во сельского хозяйства РФ, федеральное гос. бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская гос. с.-х. акад. им. акад. Д. Н. Прянишникова». – Пермь : ИПЦ Прокрость, 2017. – 123 с.
47. Технология «Nanozyme» в московском университете. Достижения и перспективы развития / Е. А. Зайцева, Ю. И. Головин, О. А. Кост и др. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2016. – Т. 57. – № 4. – С. 211–226.
48. Хабриев, Р. У. Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. – М. : Медицина, 2005. – 832 с.
49. Хитозан / под ред. К. Г. Скрябина, С. Н. Михайлова, В. П. Варламова. – М., 2013. – 593 с.
50. A mixture of anatase and rutile TiO₂ nanoparticles induces histamine secretion in mast cells / E. Y. Chen, M. Garnica, Y. C. Wang et al. // Part. Fibre Toxicol. – 9 (2012). – P. 2–3.
51. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes / D. Sun, X. Zhuang, X. Xiang et al. // Mol Ther 2010. – 18(9):1606–14.
52. A smart upconversion-based mesoporous silica nanotheranostic system for synergetic chemo-/radio-/photodynamic therapy and simultaneous / B. Fan, W. Shen, F. Bu et al. // MR/UCL imaging Biomaterials. – 35 (2014). – P. 8992–9002.

53. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics / J. D. Byrne, T. Betancourt, L. Brannon-Peppas Byrne // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 60 (2008). – P. 1615–1626.
54. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future / H. F. Zhang, K. W. Chan, H. F. Chan, K. W. Leong // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 65 (2013). – P. 104–105.
55. Aiping, Z. Synthesis and characterization of N-succinyl-chitosan and its self-assembly of nanospheres / Z. Aiping et al. // *Carbohydr. Polym.* – 2006. Vol. 66. – № 2. – P. 274–279.
56. Alarifi In vivo DNA damaging and apoptotic potential of silver nanoparticles in Swiss albino mice / M. A. Al Gurabi, D. Ali, S. Alkahtani et al. // *Onco Targets Ther.* – 8 (2015). – P. 295–302.
57. Al-Jamal, W. T. Liposomes: from a clinically established drug delivery system to a nanoparticle platform for theranostic nanomedicine / W. T. Al-Jamal, K. Kostarelos // *Acc. Chem. Res.* – 44 (2011). – P. 1094–1104.
58. Allan, D. The isolation and characterization of 60 nm vesicles ('nanovesicles') produced during ionophore A23187 – induced budding of human erythrocytes / D. Allan, P. Thomas, A. R. Limbrick // *Biochem.* – 1980, 188:881–887.
59. Allen, T. M. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications / T. M. Allen, P. R. Cullis // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 65 (2013). – P. 36–48.
60. Alvarez-Erviti, L. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes / L. Alvarez-Erviti et al. // *Nat Biotechnol.* – 2011. – 29 (4). – P. 341.
61. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery / M. A. Mohammed, J. T. M. Syeda, K. Wasan et al. // *Pharmaceutics.* – 2017. – 9 (4), 53. – <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040053>.
62. Anitha, A. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparti-

cles / A. Anitha et al. // *Carbohydr. Polym.* Elsevier Ltd, 2009. – Vol. 78. – № 4. – P. 672–677.

63. Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice / J. H. Kim, Y. S. Kim, K. Park et al. // *Journal of Controlled Release.* – 2008. – Vol. 127. – P. 41–49.

64. 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).

65. Bacterial inhibition potential of quaternised chitosan-coated VICRYL absorbable suture: An in vitro and in vivo study / Y. Yang, S.-B. Yang, Y.-G. Wang et al. // *Journal of Orthopaedic Translation.* – 2017. – V. 8. – P. 49–61.

66. Balan, V. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review / V. Balan, L. Verestiuc // *Eur. Polym. J.* Elsevier Ltd, 2014. – Vol. 53. – № 1. – P. 171–188.

67. Bandyopadhyay, D. Farmer to pharmacist: curcumin as an anti-invasive and antimetastatic agent for the treatment of cancer / D. Bandyopadhyay // *Front Chem.* – 2014; 2:113.

68. Batrakova, E. V. A macrophage-nanozyme delivery system for Parkinson's disease / E. V. Batrakova et al. // *Bioconjug Chem.* – 2007. – 18(5). – P. 1498–506.

69. Batrakova, E. V. Effects of pluronic and doxorubicin on drug uptake, cellular metabolism, apoptosis and tumor inhibition in animal models of MDR cancers / E. V. Batrakova et al. // *J Control Release.* – 2010. – 143(3). – P. 290–301.

70. Batrakova, E. V. Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion / E. V. Batrakova et al. // *Br J Cancer.* – 2001. – 85(12). – P. 1987–1997.

71. Batrakova, E. V. Optimal Structure Requirements for Pluronic Block Copolymers in Modifying P-glycoprotein Drug Efflux Transporter Activity in Bo-

vine Brain Microvessel Endothelial Cells / E. V. Batrakova et al. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2003. – 304(2). – P. 845–854.

72. Batrakova, E. V. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers / E. V. Batrakova, A. V. Kabanov // *J. Control. Release*. – 130 (2008). – P. 98–106.

73. Batrakova, E. V. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery / E. V. Batrakova, Kim Myung Soo // Review the «Americas» Special Issue of the *J Contr. Rel.* – 2015. – Aug 1. – Pii: S0168-3659(15)30042-0.
doi:10.1016/j.jconrel.2015.07.030.

74. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice *Biochem* / D. Lasagna-Reeves, M. A. Gonzalez-Romero, I. Barria et al. // *Biophys. Res. Commun.* – 393 (2010). – P. 649–655.

75. Biocompatible quantum dots for biological applications / S. J. Rosenthal, J. C. Chang, O. Kovtun et al. // *Chem. Biol.* – 18 (2011). – P. 10–24.

76. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging / A. M. Smith, H. Duan, A. M. Mohs, S. Nie // *Adv. Drug Deliv. – Rev.* – 60 (2008). – P. 1226–1240.

77. Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs / G. M. Zentner, R. Rathi, C. Shih et al. // *J. Control. Release*. – 72 (2001). – P. 203–215.

78. Biological impact assessment of nanomaterial used in nanomedicine / L. Juillerat-Jeanneret, M. Dusinska, L. M. Fjellsbo et al. // Introduction to the NanoTEST project *Nanotoxicology*. – 9 (Suppl. 1) (2015). – P. 5–12.

79. Caliceti, F. M. V. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly (ethylene glycol) protein conjugates / F. M. V. Caliceti // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 55 (2003). – P. 1261–1277, 55 (2003). – P. 1261–1277.

80. Carreño-Gómez, B. Evaluation Of the biological properties of 121 soluble chitosan and chitosan microspheres / B. Carreño-Gómez, R. Duncan // *Int. J. Pharm.* – 1997. – Vol. 148. – № 2. – P. 231–240.

81. Casettari, L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs / L. Casettari, L. Illum // *J. Control. Release Society.* – 2014. – Vol. 190. – P. 189–200.
82. Cell-penetrating CNTs for delivery of therapeutics / L. Lacerda, S. Raffa, M. Prato et al. // *Nano Today.* – 2 (2007). – P. 38–43.
83. Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells / S. Park, Y. K. Lee, M. Jung et al. // *Inhal. Toxicol.* – 19 (2007). – P. 59–65.
84. Cellular uptake and cytotoxicity of drug: peptide conjugates regulated by conjugation site / P. Zhang, A. G. Cheetham, L. L. Lock, H. Cui // *Bioconjug. Chem.* – 24 (2013). – P. 604–613.
85. Chan, H. K. Nanodrug particles and nanoformulations for drug delivery / H. K. Chan // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2011. – Vol. 63. – № 6. – P. 405.
86. Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro / M. L. Auffan, J. R. M. Rose, M. R. Wiesner et al. // *Environ. Pollut.* – 157 (2009). – P. 1127–1133.
87. Chen, S. Functionalized single-walled carbon nanotubes as rationally designed vehicles for tumor-targeted drug delivery / S. Chen, X. Zhao, L. V. Kuznetsova et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 130 (2008). – P. 16778–16785.
88. Cheng, B. A. Formulation of functionalized PLGAPEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery / B. A. Cheng, I. Teply, J. Sherifi // *Biomaterials*, 28 (2007). – P. 869–876.
89. Chevrier, A. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects / A. Chevrier, C. D. Hoemann, J. Sun, M. D. Buschmann // *Osteoarthritis Cartil.* – 2007. – V. 15. – P. 316–327.
90. Chirality affects aggregation kinetics of single-walled carbon nanotubes / I. A. Khan, A. N. Afrooz, J. R. Flora et al. // *Environ. Sci. Technol.* – 47 (2013). – P. 1844–1852.

91. Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities // Edited by: Silvia Bautista-Banos, Gianfranco Romanazzi and Antoinio Jiménez-Aparicio // Academic Press. – 2016. – 384 p.
92. Chitosan/alginate multilayer scaffold encapsulating bone marrow stromal cells in situ on titanium / Y. Wu, N. Chen, L. K. Liu et al. // *J. Bioact. Compat. Polym.* – 2009. – 24. – P. 301–315.
93. Chitosan-graft- β -cyclodextrin nanoparticles as a carrier for controlled drug release / Z. Yuan, Y. Ye, F. Gao et al. // *Int. J. Pharm.* – 2013. – 446. – P. 191–198.
94. Chuang, H. C. Surface area as a dose metric for carbon black nanoparticles: a study of oxidative stress. DNA single-strand breakage and inflammation in rats *Atmos* / H. C. Chuang, L. C. Chenc, Y. C. Leic et al. // *Environ.* – 106 (2015). – P. 10–12.
95. Ciesla, M. MicroRNAs as biomarkers of disease onset / M. Ciesla, K. Skrzypek, M. Kozakowska et al. // *Anal. Bioanal. Chem* 2011; 401(7):2051–61.
96. Cleavable ester-linked magnetic nanoparticles for labeling of solvent-exposed primary amine groups of peptides/proteins / U. S. Patil, L. Osorno, A. Ellender et al. // *Anal. Biochem.* – 484 (2015). – P. 18–20.
97. 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.<https://doi.org/10.1088/1755-1315/403/1/012107>.
98. Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation / D. K. Jeppesen, M. L. Hvam, B. Primdahl-Bengtson et al. // *J Extracell Vesicles.* – 2014. – № 3. – P. 25011.
99. Comprehensive toxicity and immunogenicity studies reveal minimal effects in mice following sustained dosing of extracellular vesicles derived from HEK293T cells / X. Zhu, M. Badawi, S. Pomeroy et al. // *Journal of Extracellular*

Vesicles. – 6. – 2017. – P. 1324730. – <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1324730>.

100. Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives / I. Aranaz, N. Acosta, C. Civera et al. // *Polymers*. – 2018. – V. 10. – № 2. – P. 213.

101. Cross-linked chitosan-dextran sulphate vehicle system for controlled release of ciprofloxacin drug: An ophthalmic application / C. Chavana, P. Bala, K. Pal, S. N. Kale // *Open Nano*. – 2017. – V. 2. – P. 28–36.

102. Dai, S. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer / S. Dai, D. Wei, Z. Wu et al. // *Mol Ther* 2008; 16(4):782–90.

103. Delehanty, J. B. Delivering quantum dots into cells: strategies, progress and remaining issues / J. B. Delehanty, H. Mattoussi // *Anal. Bioanal. Chem.* – 393 (2009). – P. 1091–1105.

104. Development of a Drug Delivery System Based on Chitosan Nanoparticles for Oral Administration of Interferon- α / C. Cánepa, J. C. Imperiale, C. A. Berini et al. // *Biomacromolecules*. – 2017. – V. 18. – № 10. – P. 3302–3309.

105. Dextran-coated superparamagnetic nanoparticles as potential cancer drug carriers in vitro / M. Peng, H. Li, Z. Luo et al. // *Nanoscale*. – 7 (2015). – P. 11155–11162.

106. Di Martino, A. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue engineering / A. Di Martino, M. Sittinger, M. V. Risbud // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – P. 5983–5990.

107. Diener, W. Acute Toxicity Class Methods: Alternatives to Tests / W. Diener, E. Schlede // *ALTEX* 16, 1999. – P. 129–134.

108. Dietary phenolics against colorectal cancer – from promising preclinical results to poor translation into clinical trials: Pitfalls and future needs / M. A. Núñez-Sánchez, A. González-Sarrías, M. Romo-Vaquero et al. // *Mol Nutr Food Res*. – 2015. – 59(7). – P. 1274–91.

109. Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots / J. Lovrić, H. Bazzi, Y. Cuie et al. // *J. Mol. Med.* – 83 (2005). – P. 377–385.
110. Discher Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery / P. Geng, S. Dalhaimer, R. Cai et al. // *Nat. Nanotechnol.* – 2 (2007). – P. 249–255.
111. Dobson, P. D. Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? / P. D. Dobson, D. B. Kell // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 7 (2008). – P. 205–220.
112. Dominance of goethite over hematite in iron oxides of mineral dust from Western Africa: quantitative partitioning by X-ray absorption spectroscopy / S. Formenti, S. Caquineau, A. Chevaillier et al. // *J. Geophys. Res. Atmos.*, 119 (2014). – P. 12740–12754.
113. Dual enzyme-like activities of iron oxide nanoparticles and their implication for diminishing cytotoxicity / J.-J. Chen, Y.-T. Zhou, Y. Zhang et al. // *ACS Nano*, 6 (2012). – P. 4001–4012.
114. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms / R. J. Griffitt, J. Luo, J. Gao et al. // *Environ. Toxicol. Chem.* – 27 (2008). – P. 1972–1978.
115. Enhancement of alendronate encapsulation in chitosan nanoparticles / K. Miladi, S. Sfar, H. Fessi, A. Ellassari // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* – 2015. – 30. – P. 391–396.
116. Escudier, B. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial / B. Escudier et al. // *J Transl Med.* – 2005. – 3(1). – P. 10.
117. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). – Strasbourg, 1986.
118. Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts / J. C. K. Lai, M. B. Lai, S. Jandhyam et al. // *J. Nanomed.* – 3 (2008). – P. 533–545.

119. Extracellular vesicle-mediated delivery of molecular compounds into gametes and embryos: learning from nature Natalia Barkalina, Celine Jones, Matthew J. A. Wood, and Kevin Coward // *Human Reproduction Update*. – Vol. 21. – № 5, 2015. – P. 627–639.
120. Fabrication and in vitro evaluation of calcium phosphate combined with chitosan fibers for scaffold structures / Q. Lian, D. Li, Z. Jin et al. // *J. Bioact. Compat. Polym.* – 2009. – V. 24. – P. 113–124.
121. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles / F. Alexis, E. Pridgen, K. Molnar, O. C. Farokhzad // *Mol. Pharm.* – 5 (2008). – P. 505–515.
122. Farokhzad, O. C. Impact of nanotechnology on drug delivery ACS / O. C. Farokhzad, R. Langer // *Nano*. – 3 (2009). – P. 16–20.
123. Ferech, M. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe / M. Ferech, S. Coenen, S. Malhotra-Kumar et al. // *J Antimicrob Chemother.* – 2006. – 58 (2). – P. 401–407.
124. Foda, N. H. Implantable biodegradable sponges: Effect of interpolymer complex formation of chitosan with gelatin on the release behavior of tramadol hydrochloride / N. H. Foda, M. El-Iaithy, I. Tadros // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2007. – 33. – P. 7–17.
125. Fractal structures of single-walled carbon nanotubes in biologically relevant conditions: role of chirality vs. media conditions / I. A. Khan, N. Aich, A. N. Afrooz et al. // *Chemosphere*. – 93 (2013). – P. 1997–2003.
126. Gold and iron oxide hybrid nanocomposite materials / K. C. F. Leung, S. H. Xuan, X. M. Zhu et al. // *Chem. Soc. Rev.* – 41 (2012). – P. 1911–1928.
127. Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology / Z. Wang, J. Li, J. Wang, Y. Lin // *Trends Biotechnol.* – 29 (2010). – P. 205–212.
128. Graphene quantum dots conjugated albumin nanoparticles for targeted drug delivery and imaging of pancreatic cancer / S. Nigam, M. Waghmode, S. Louis et al. // *J. Mater. Chem. B*. – 2 (2014). – P. 3190–3195.

129. Guan, T. Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles *Nanoscale* / T. Guan, F. Kang, Z. Lu et al. // *Res. Lett.* – 7 (1) (2012). – P. 602.
130. Guo, A. S. Naturally occurring iron oxide nanoparticles: morphology, surface chemistry and environmental stability / A. S. Guo // *J. Mater. Chem.* – 1 (2013). – P. 27–42.
131. Hackenberg, S. Functional responses of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to metal oxide nanoparticles in vitro / S. Hackenberg, A. Scherzed, A. Technau et al. // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 9 (1) (2013). – P. 86–95.
132. Haney, M. J. Specific Transfection of Inflamed Brain by Macrophages: A New Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases / M. J. Haney et al. // *Plos One.* – 2013. – 8(4). – P. e61852.
133. Hejazi, M. Amiji Chitosan-based gastrointestinal delivery systems / M. Hejazi // *J. Control. Release.* – 89 (2003). – P. 151–165.
134. Heneweer, S. E. M. Peñate-Medina Liposomes and inorganic nanoparticles for drug delivery and cancer imaging / S. E. M. Heneweer, O. Gendy // *Ther. Deliv.* – 3 (2012). – P. 645–656.
135. High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide / X. Yang, Z. Liu, Y. Ma et al. // *J. Phys. Chem. C.* – 112 (2008). – P. 17554–17558.
136. <https://www.bccresearch.com/market-research/pharmaceuticals/advanced-drug-delivery-systems-tech-markets-report.html> (дата обращения 25.05.2020).
137. Huang, G. Chitosan and its derivatives as vehicles for drug delivery / G. Huang, Y. Liu, L. Chen // *Journal Drug Delivery.* – 2017. – V. 24. – № 2. – P. 108–113.
138. Huang, Y. Factors affecting the stability of chitosan/tripolyphosphate micro- and nanogels: resolving the opposing findings / Y. Huang, Y. Cai, Y. Lapitsky // *J. Mater. Chem. B.* – 2015. – Vol. 3. – P. 5957–5970.

139. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings / K. Murakami, H. Aoki, S. Nakamura et al. // *Biomater.* – 2010. – V. 31. – P. 83–90.
140. Hyperthermia and thermosensitive liposomes for improved delivery of chemotherapeutic drugs to solid tumors / A. M. Koning, L. Eggermont, T. M. Lindner, Hagen Ten // *Pharm. Res.* – 27 (2010). – P. 1750–1754.
141. Il'ina, A. V. Chitosan-based polyelectrolyte complexes: a review / A. V. Il'ina, V. P. Varlamov // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2005. – V. 41. – P. 5–11.
142. In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots / L. Gao, J. A. Yang, F. F. Petros et al. // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 16 (2008). – P. 63–72.
143. Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions / L. Salvia-Trujillo, C. Qian, O. Martín-Belloso, D. J. McClements // *Food Chem.* – 141 (2013). – P. 1472–1480.
144. Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans* / J. N. Meyer, C. A. Lord, X. Y. Yang et al. // *Aquat. Toxicol.* – 100 (2010). – P. 140–150.
145. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids / C. Théry, S. Amigorena, G. Raposo, A. Clayton // *Current protocols in cell biology.* – 2006. – C. 3221–3229.
146. Jaeger, D. G. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human / D. G. Jaeger, L. Weiss, R. Jonas, R. Kriehuber // *HaCaT keratinocytes Toxicology.* – 296 (2012). – P. 27–36.
147. Janib, S. M. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles / S. M. Janib, A. S. Moses, J. A. Mackay // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 62 (2010). – P. 1052–1063.
148. Josefsen, L. B. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics / L. B. Josefsen, R. W. Boyle // *Theranostics.* – 2 (2012). – P. 916–966.

149. 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).
150. Kayal, S. Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery / S. Kayal, R. V. Ramanujan // *Mater. Sci. Eng. C*. – 30 (2010). – P. 484–490.
151. Kean, T. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: Cytotoxicity and transfection efficiency / T. Kean, S. Roth, M. Thanou // *J. Control. Release*. – 2005. – Vol. 103. – № 3. – P. 643–653.
152. Kim, M. S. Exosome Mediated Delivery of Paclitaxel for the Treatment of Multi-drug Resistant Pulmonary Metastases / M. S. Kim. – 2016. – Режим доступа: <https://doi.org/10.17615/49py-6m17>
153. Kumari, S. K. Biodegradable polymeric nanoparticles-based drug delivery systems / S. K. Kumari, S. C. Yadav // *Colloids Surf. B*. – 75 (2010). – P. 1–18.
154. Li, J. Yu. Mesoporous silica functionalized with an AIE luminogen for drug delivery / J. Yu. Li, R. Xu // *Chem. Commun.* – 47 (2011). – P. 11077–11079.
155. Li, P. Anisotropic gold nanoparticles: synthesis, properties, applications, and toxicity / P. Li, D. Zhao, D. Astruc // *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* – 53 (2014). – P. 1756–1789.
156. Liang, M. Wei Inorganic nanomaterials for bioimaging, targeted drug delivery and therapeutics / M. Liang, D. G. Evans, X. Duan // *Chem. Commun.* – 50 (2014). – P. 14071–14081.
157. Lin, H. -Y. Controlled release of pentoxifylline from porous chitosan-pectin scaffolds / H. -Y. Lin, C. -T. Yeh // *Drug Delivery*. – 2010. – V. 17. – P. 313–321.
158. Liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review / J. Lao, J. Madani, T. Puértolas et al. // *J. Drug Deliv.* – 2013. – P. 12.

159. Liposomes as targeted drug delivery systems in the treatment of breast cancer / S. Sharma, C. Anabousi, M. N. Ehrhardt, V. R. Kumar // *J. Drug Target.* – 14 (2006). – P. 301–310.
160. Liu, H. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing / H. Liu, C. Wangab, C. Li et al. // *RSC Adv.* – 2018. – V. 8. – P. 7533–7549.
161. Liu, J. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications / J. Liu, L. Cui, D. Losic // *Acta Biomater.* – 9 (2013). – P. 9243–9257.
162. Luminescent Biocompatible / M. Bruchez, C. Hotz, E. Goldman et al. // *Quantum Dots.* – Vol. 374. – Humana Press, 2007. – P. 207–227.
163. Lyophilized paclitaxel magnetoliposomes as a potential drug delivery system for breast carcinoma via parenteral administration: in vitro and in vivo studies / J. Q. Zhang, Z. R. Zhang, H. Yang et al. // *Pharm. Res.* – 22 (2005). – P. 573–583.
164. Makhlof, A. Design and evaluation of novel pHsensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery / A. Makhlof, Y. Tozuka, H. Takeuchi // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2011. – 42. – P. 445–451.
165. Malam, M. L Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer Trends / M. L. Malam, A. M. Seifalian // *Pharmacol. Sci.* – 30 (2009). – P. 592–599.
166. Mechanism of Surface Charge Triggered Intestinal Epithelial Tight Junction Opening Upon Chitosan Nanoparticles for Insulin Oral Delivery / J. Wang, M. Kong, Z. Zhou et al. // *Carbohydr. Polym.* – 2017. – V. 157. – P. 596–602.
167. Mechanisms of polymer degradation and erosion / A. Göpferich // *Biomaterials.* – 1996. – Vol. 17. – P. 103–114.
168. Mesoporous silica nanorods intrinsically doped with photosensitizers as a multifunctional drug carrier for combination therapy of cancer / G. Yang, H. Gong, X. Qian et al. // *Nano Res.* – 8 (2015). – P. 751–764.

169. Metastatic latency and immune evasion through autocrine inhibition of WNT / S. Malladi, D. G. Macalinao, X. Jin et al. // *Cell* 2016. – 165(1). – P. 45–60.
170. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma / A. S. Lawrie, A. Albanyan, R. A. Cardigan et al. // *Vox sanguinis*. – 2009. – T. 96. – №. 3. – C. 206–212.
171. Mignot, G. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer / G. Mignot et al. // *J. Cell Mol Med*. – 2006. – 10(2). – P. 376–88.
172. Morse, M. A. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer / M. A. Morse et al. // *J. Transl. Med.* – 2005. – 3(1). – P. 9.
173. Multifunctional hybrid nanocarrier: magnetic CNTs ensheathed with mesoporous silica for drug delivery and imaging system ACS / R. K. Singh, K. D. Patel, J.-J. Kim et al. // *Appl. Mater. Interfaces*. – 6 (2014). – P. 2201–2208.
174. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting / M. Liong, J. Lu, M. Kovoichich et al. //
175. Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems / E. Nasongkla, J. Bey, H. Ren et al. // *Nano Lett.* – 6 (2006). – P. 2427–2430.
176. Multiwalled Carbon nanotube-Chitosan Scaffold: Cytotoxic, apoptotic, and necrotic effects on chondrocyte cell lines / S. Ilbasmis-Tamer, H. Çiftçi, M. R. Tu et al. // *Curr Pharm Biotechnol*. – 2017. – V. 18. – № 4. – P. 327–335.
177. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy / J. Peer, M. Karp, S. Hong et al. // *Nat. Nanotechnol.* – 2 (2007). – P. 751–760.
178. Nanoscale drug delivery platforms overcome platinum-based resistance in cancer cells due to abnormal membrane protein trafficking / M. D. Xue, Q. Hall, P. C. Zhang et al. // *ACS Nano*. – 7 (2013). – P. 10452–10464.
179. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system / Z. Bamrungsap, T. Zhao, L. Chen et al. // *Nanomedicine*, 7 (2012). – P. 1253–1271. – 7 (2012). – P. 1253–1271.

180. Novel alginate-gelatin hybrid nanoparticle for drug delivery and tissue engineering applications / E. M. Lee, D. Singh, S. M. Choi et al. // *J. Nanomater.* – 2014. – P. 7.
181. Novel Hydrophilic Chitosan–Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers / P. Calvo, C. Remuñán-López, J. L. Vila-Jato and M. J. Alonso // *Journal of Applied Polymer Science.* – 1997. – Vol. 63. – P. 125–132.
182. On the cyto-toxicity caused by quantum dots / A. Shiohara, K.-I. Hoshino, K. Hanaki et al. // *Microbiol. Immunol.* – 48 (2004). – P. 669–675.
183. Opanasopit, P. Effect of salt forms and molecular weight of chitosans on in vitro permeability enhancement in intestinal epithelial cells (Caco-2) / P. Opanasopit et al. // *Pharm. Dev. Technol.* – 2007. – Vol. 12. – P. 447–455.
184. 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.
185. Patel, M. M. Colon: a gateway for chronotherapeutic drug delivery systems / M. M. Patel // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 12 (2015). – P. 1389–1395.
186. Patent US 8236781B2 Int. Cl. A6 IK3I/722, A6 IK 8/02. Hydrogel of chitosan carboxyalkylamide, preparation thereof and cosmetic and dermatological use thereof / E. Laugier, F. Gouchet, J.-P. Perraud. – Pub. Date: 15.06.2009.
187. Pattni, B. S. Torchilin New developments in liposomal drug delivery / B. S. Pattni, V. V. Chupin, V. P. Torchilin // *Chem. Rev.* – 115 (19) (2015). – P. 10938–10966.
188. Pogorielov, V. M. Chitosan as a Hemostatic Agent: Current State / V. M. Pogorielov, V. Z. Sikora // *Article (PDF Available).* – 2015. – P. 1–16.
189. Polymeric micelles drug delivery system in oncology / J. Gong, M. Chen, Y. Zheng, Y. Wang // *J. Control. Release.* – 159 (2012). – P. 312–323.
190. Polymeric nanoparticles as oral delivery systems for encapsulation and release of polyphenolic compounds: impact on quercetin antioxidant activity & bioaccessibility Food / H. Pool, D. Quintanar, J. Figueroa et al. // *Biophys.* – 7 (2012). – P. 276–288.

191. Polymeric nanoparticles for drug delivery / S. R. Grobmyer, B. M. Moudgil, J. Chan et al. // *Cancer Nanotechnol.* – 224 (2010). – P. 163–175.
192. Polymeric systems for controlled drug release / K. E. Uhrich, S. M. Cannizzaro, R. S. Langer, K. M. Shakesheff // *Chem. Rev.* – 99 (1999). – P. 3181–3198.
193. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture / Q. Hu, B. Li, M. Wang, J. Shen // *Biomaterials.* – 2004. – V. 25. – P. 779–785.
194. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells / H. G. Lamparski et al. // *J. Immunol Methods.* – 2002. – 270 (2). – P. 211–26.
195. Production of new hybrid systems for drug delivery by PGSS (particles from gas saturated solutions) process / Á. Fraile, D. Martín, S. Deodato et al. // *J. Supercrit. Fluids.* – 81 (2013). – P. 226–235.
196. Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPAR as an exosome-associated protein / C. Looze, D. Yui, L. Leung et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – V. 378. – P. 433–438.
197. Qi, L. Emerging application of quantum dots for drug delivery and the rapy / L. Qi, X. Gao // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 5 (2008). – P. 263–267.
198. Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design / C. E. Probst, P. Zrazhevskiy, V. Bagalkot, X. Gao // *Adv. Drug Deliv. – Rev.* – 65 (2013). – P. 703–718.
199. Quantum dots in cancer therapy / J. Luo, B. Long, C. Zhang et al. // *Expert. Opin. Drug Deliv.* – 9 (2012). – P. 47–58.
200. Quantum dotsaptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer / L. Z. Bagalkot, E. Levy-Nissenbaum, S. Jon et al. // *Nano Lett.* – 7 (2007). – P. 3065–3070. – 7 (2007). – P. 3065–3070.

201. Quiñones, J. P. Chitosan Based Self-Assembled Nanoparticles in Drug Delivery / J. P. Quiñones, H. Peniche, C. Peniche // *Polymers*. – 2018. – V. 10. – № 3. – P. 235–268.
202. Rapoport, N. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery / N. Rapoport. – <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.009>.
203. Reynolds, R. L. Iron oxide minerals in dust of the Red Dawn event in eastern Australia / R. L. Reynolds, S. R. Cattle, B. M. Moskowitz et al. // *Aeolian Res.* – 15 (2014). – P. 1–13.
204. Richardson, S. C. W. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: Biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA / S. C. W. Richardson, H. V. J. Kolbe, R. Duncan // *Int. J. Pharm.* – 1999. – Vol. 178. – № 2. – P. 231–243.
205. Rod-shaped iron oxide nanoparticles are more toxic than sphere-shaped nanoparticles to murine macrophage cells / J. H. Lee, J. E. Ju, B. I. Kim et al. // *Environ. Toxicol. Chem.* – 33 (2015). – P. 2759–2766.
206. Roll, R. Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien / R. Roll, U. Mischke, D. Kayser // *Bundesgesundheitsblatt*. – 1989. – 32. – P. 336–341.
207. Rouanet Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats: effects on oxidative stress and inflammation / E. Ebabe, S. Gaillet, J. Vide et al. // *Food Chem. Toxicol.* – 60 (2013). – P. 297–301.
208. Ryman-Rasmussen, J. P. Variables influencing interactions of untargeted quantum dot nanoparticles with skin cells and identification of biochemical modulators / J. P. Ryman-Rasmussen, J. E. Riviere, N. A. Monteiro-Riviere // *Nano Lett.* – 7 (2007). – P. 1344–1348.
209. Samad, Y. S. Liposomal drug delivery systems: an update review / Y. S. Samad, M. Aqil // *Curr. Drug Deliv.* – 4 (2007). – P. 297–305.

210. Sao, R. Multifunctional drug delivery systems using inorganic nano-materials: a review / R. Sao, R. Vaish, N. Sinha // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 15 (2015). – P. 1960–1972.

211. Schipper, N. G. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells / N. G. Schipper, K. M. Vårum, P. Artursson // *Pharm. Res.* – 1996. – Vol. 13. – № 11. – P. 1686–1692.

212. Shakeel, A. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing / A. Shakeel, I. Saiqa // *Achievements in the Life Sciences.* – 2016. – V. 10. – № 1. – P. 27–37.

213. Shum, P. Phototriggering of liposomal drug delivery systems / P. Shum, J.-M. Kim, D. H. Thompson // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 53 (2001). – P. 273–284.

214. Singh, R. Medical applications of nanoparticles in biological imaging, cell labeling, antimicrobial agents and anticancer nanodrugs / R. Singh, H. S. Nalwa // *J. Biomed Nanotechnol.* – 2011. – Vol. 7. – № 44. – P. 489–503.

215. Singh, R. Nanoparticle-based targeted drug delivery / R. Singh, J. W. Lillard // *Exp. Mol. Pathol.* – 2009. – 86. – P. 215–223.

216. Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice / L. Yang, H. Kuang, W. Zhang et al. // *Nanoscale.* – 7 (2015). – P. 625–636.

217. Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery / E. C. Dreaden, L. A. Austin, M. A. Mackey et al. // *Ther. Deliv.* – 3 (2012). – P. 457–478.

218. Size-dependent optical properties of colloidal PbS quantum dots ACS / K. Moreels, D. Lambert, D. Smeets et al. // *Nano.* – 3 (2009). – P. 3023–3030.

219. Study of subchronic toxicity of the developed antibacterial drug based on exosomal particles / E. Kastarnova, V. Orobets, V. Shahova et al. // *XIII Inter-*

national Scientific and Practical Conference «State and Prospects for the Development of Agribusiness – INTERAGROMASH 2020», Volume 175 (2020). – <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202017507002>.

220. 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). – <https://doi.org/10.1051/e3sconf/201913501096>

221. Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery / Z. Liu, X. Sun, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai // ACS Nano. – 1 (2007). – P. 50–56.

222. Sutton, N. Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery / N. Sutton, E. Nasongkla, E. Blanco, J. Gao // Pharm. Res. – 24 (2007). – P. 1029–1046.

223. Svirshchevskaya, E. V. Analysis of toxicity and biocompatibility of chitosan derivatives with different physico-chemical properties / E. V. Svirshchevskaya et al. // Appl. Biochem. Microbiol. – 2016. – Vol. 52. – № 5. – P. 483–490.

224. Tailor-made dual pH-sensitive polymer doxorubicin nanoparticles for efficient anticancer drug delivery / J.-Z. Du, X.-J. Du, C.-Q. Mao et al. // J. Am. Chem. Soc. – 133 (2011). – P. 17560–17563, 133 (2011). – P. 17560–17563.

225. Targeted drug delivery system: formulation and evaluation of chitosan nanospheres containing doxorubicin hydrochloride / S. A. Dhanaraj, M. Selvadurai, K. Santhi et al. // Int. J. Drug Deliv. – 2014. – 6. – P. 186–193.

226. Tetracycline release from tripoly phosphate-chitosan cross-linked sponge: a preliminary in vitro study / E. C. Shen, C. Wang, E. Fu et al. // J. Periodontal Res. – 2008. – V. 43. – P. 642–648.

227. The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral) / W. Diener, L. Sichha, U. Mischke, E. Schlede // Arch. Toxicol. – 1994. – 68. – P. 559–610.

228. The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral) / W. Diener, U. Mischke, D. Kayser, E. Schlede // *Arch. Toxicol.* – 1995. – 69. – P. 729–734.

229. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems Annu / P. S. Tang Albanese, W. C. Chan Albanese, P. S. Tang, W. C. Chan // *Rev. Biomed. Eng.* – 14 (2012). – P. 1–16.

230. The influence of surface charge and photo-reactivity on skin-permeation enhancer property of nano-TiO₂ in ex vivo pig skin model under indoor light / F. Peira, I. Turci, D. Corazzari et al. // *Int. J. Pharm.* – 5 (2014). – P. 90–99.

231. Therapeutic uses of exosomes / Z. E. Suntres, M. G. Smith, F. Momen-Heravi et al. // *Exosomes and Microvesicles.* – 2013. – V. 1. – P. 9.

232. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery / O. Feron Danhier, V. R. Pr at Danhier, O. Feron, V. R. Pr at // *J. Control. Release.* – 148 (2010). – P. 135–146, 148 (2010). – P. 135–146.

233. Triggered destabilisation of polymeric micelles and vesicles by changing polymers polarity: an attractive tool for drug delivery / C. J. F. Rijcken, O. Soga, W. E. Hennink, C. F. V. Nostrum // *J. Control. Release.* – 120 (2007). – P. 131–148.

234. Tumor-homing multifunctional nanoparticles for cancer the ragnosis: simultaneous diagnosis, drug delivery, and the rapeutic monitoring / K. Kim, J. H. Kim, H. Park et al. // *J. Control. Release.* – 146 (2010). – P. 219–227.

235. Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids / B. J. Tauro, D. W. Greening, R. A. Mathias et al. // *Mol Cell Proteomics.* – 2013. – Vol. 12. – № 3. – P. 587–598.

236. Veiseh, J. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging / J. Veiseh, W. Gunn, M. Zhang // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 62 (2010). – P. 284–304.

237. Versatility of Chitosan-Based Biomaterials and Their Use as Scaffolds for Tissue Regeneration / J. C. V. Ribeiro, R. S. Vieira, I. M. Melo et al. // *The Scientific World Journal*. – 2017. – V. 2017. – P. 1–25.
238. Vivero-Escoto, J. L. Stimuli-responsive protoporphyrin IX silica-based nanoparticles for photodynamic therapy in vitro RSC / J. L. Vivero-Escoto, D. L. Vega // *Adv.* – 4 (2014). – P. 14400–14407.
239. Wang, A. Z. Nanoparticle delivery of cancer drugs / A. Z. Wang, R. Langer, O. C. Farokhzad // *Annu. Rev. Med.* – 63 (2012). – P. 185–198.
240. Wang, L. Chen Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine / L. Wang // *Nanomedicine*. – 7 (2011). – P. 385–402.
241. Wedmore, I. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations / I. Wedmore et al. // *J. Trauma*. – 2006. – Vol. 60. – № 3. – P. 655–658.
242. Wilhelmi, U. Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox- and Nrf2-independent manner PLoS / U. Wilhelmi, H. Fischer, K. Weighardt et al. // *One*. – 8 (6) (2013).
243. Wu, T. Chitosan-based composite hydrogels for biomedical applications / T. Wu, Y. Li, D. S. Lee // *Macromolecular Research*. – 2017. – V. 25. – № 6. – P. 480–488.
244. www.bccresearch.com/market-research/pharmaceuticals/advanced-drug-delivery-markets-phm006j.html (дата обращения 25.05.2020) // *Global Markets and Technologies for Advanced Drug Delivery Systems*.
245. Xu, S. S. New forms of superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications / S. S. Xu // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 65 (2013). – P. 732–743/
246. Yang, L. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation / L. Yang, J. S. Chu, J. A. Fix // *Int. J. Pharm.* – 235 (2002). – P. 1–15.
247. Yang, S. Diffuse reflectance spectroscopic analysis of iron-oxide minerals in dust aerosol from Golmud / S. Yang, Y. Sheng, Y. Han et al. // *J. Lanzhou Univ. Nat. Sci.* – 50 (2014). – P. 710–715.

248. Yao, M. Delivery of lipophilic bioactives: assembly, disassembly, and reassembly of lipid nanoparticles / M. Yao, H. Xiao, D. J. McClements // *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* – 5 (2014). – P. 53–81.

249. Yeo, R. W. Mesenchymal stem cell: An efficient mass producer of exosomes for drug delivery / R. W. Yeo et al. // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2012.

250. Zrazhevskiy, P. Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery / P. Zrazhevskiy, M. Sena, X. Gao // *Chem. Soc. Rev.* – 39 (2010). – P. 4326–4354.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Патент Российской Федерации на изобретение «Способ получения экзосом из крови»



Патент Российской Федерации на изобретение «Способ изоляции
экзосом из крови»



Патент Российской Федерации на изобретение «Способ лечения
ягнят при бронхопневмонии»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2731567

Способ лечения ягнят при бронхопневмонии

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ставропольский государственный аграрный университет" (RU)*

Авторы: *Кастарнова Елена Сергеевна (RU), Оробец Владимир Александрович (RU), Шахова Валерия Николаевна (RU), Ковалев Дмитрий Анатольевич (RU), Жиров Андрей Михайлович (RU)*

Заявка № 2019141207

Приоритет изобретения 11 декабря 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 04 сентября 2020 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 11 декабря 2039 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев



5. Внедрены в технологию проведения ветеринарных мероприятий ягнят при терапии бронхопневмонии в ООО «СХП Новомарьевское» Шпаковского района, Ставропольского края

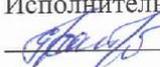
6. Социально-экономический и научно-технический эффект: селективные препараты Экзазит и Хитазит являются безопасными. Применение разработанных селективных препаратов позволяет сократить сроки и повысить эффективность терапии ягнят при острой бронхопневмонии

Сдал:
От ВУЗа

ФГБОУ ВО Ставропольский государственный аграрный университет
Ставропольский край, г. Ставрополь,
пер. Зоотехнический 12

Руководитель НИР

В.А. Оробец
2020 г.

Исполнитель НИР

Е.С. Кастарнова
2020 г.



Принял:
От предприятия

ООО «СХП Новомарьевское»
Ставропольский край,
Шпаковский район
Главный ветеринарный врач

М.И. Тананаев
2020 г.

Ветеринарный врач


В.Б. Сундарев
2020 г.



Акт внедрения результатов научно-исследовательских работ в ветеринарную практику ООО «Николина-Нива»

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной и инновационной работе ФГБОУ ВО Ставропольского ГАУ, профессор
А.Н. Бобрышев
2020г.



УТВЕРЖДАЮ
Директор
ООО «Николина-Нива»
В.И. Зинченко
2020г.
М.П.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технических работ

Заказчик: ООО «Николина-Нива»
(наименование организации)

Директор Зинченко Валентина Ивановна
(представитель организации)

Настоящим актом подтверждается, что результаты научно-исследовательской работы по теме «Разработка и клинико-терапевтическая оценка эффективности селективных препаратов»
(наименование темы)

Выполненной: Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский государственный аграрный университет»
(наименование ВУЗа)

Внедрены в ООО «Николина-Нива» Грачевского района, Ставропольского края
(наименование предприятия, где осуществлялось внедрение)

1. Вид внедрения результатов: селективные препараты Хитазит и Экзазит
2. Характеристика масштаба внедрения: партии препаратов для ветеринарных мероприятий ягнят при терапии острой бронхопневмонии
3. Форма внедрения: опытные партии селективных препаратов
4. Новизна результатов научно-исследовательских работ: получены качественно новые результаты по эффективности применения селективных препаратов

5. Внедрены в технологию проведения ветеринарных мероприятий ягнят при терапии бронхопневмонии в ООО «Николина-Нива» Грачевского района, Ставропольского края
6. Социально-экономический и научно-технический эффект: селективные препараты Экзазит и Хитазит являются безопасными. Применение разработанных селективных препаратов позволяет сократить сроки и повысить эффективность терапии ягнят при острой бронхопневмонии

<p>Сдал: От ВУЗа</p> <p>ФГБОУ ВО Ставропольский государственный аграрный университет Ставропольский край, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический 12</p> <p>Руководитель НИР <i>В.А. Оробец</i> В.А. Оробец <i>5. марта</i> 2020 г.</p> <p>Исполнитель НИР <i>Е.С. Кастарнова</i> Е.С. Кастарнова <i>5. марта</i> 2020 г.</p> 	<p>Принял: От предприятия</p> <p>ООО «Николина-Нива» Ставропольский край, Грачевский район</p> <p>Директор <i>В.И. Зинченко</i> В.И. Зинченко <i>5. марта</i> 2020 г.</p> <p>МП</p> 
--	--

Акт внедрения результатов научно-исследовательских работ в учебный процесс кафедры терапии и фармакологии ФГБОУ ВО «Ставропольский ГАУ»

УТВЕРЖДАЮ
 Директор по научной и инновационной работе ФГБОУ ВО Ставропольский ГАУ, профессор

 _____ А.Н. Бобрышев
 _____ 2020г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ
результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технических работ

Наименование материалов, предложенных к внедрению: материалы кандидатской диссертации Кастарновой Елены Сергеевны на тему «Разработка и клинико-терапевтическая оценка эффективности селективных препаратов».

Кем предложено: аспирантом кафедры терапии и фармакологии Кастарновой Е.С.

Где внедрено: в учебный процесс кафедры терапии и фармакологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет».

Результаты применения: в ходе учебного процесса с представленными научно-исследовательскими данными ознакомлено 150 студентов очной и заочной формы обучения (лекции и лабораторно-практические занятия).

Эффективность внедрения: углубление знаний по особенностям разработки, фармакологическим терапевтическим свойствам селективных препаратов.

Протокол № 13 от 2 июня 2020 г.

Ответственный за внедрение:

Заведующий кафедрой
 терапии и фармакологии
 ФГБОУ ВО «Ставропольский
 государственный аграрный университет»,
 доктор ветеринарных наук, профессор

 В.А. Орбеч

**Акт внедрения результатов научно-исследовательских работ в учебный процесс кафедры фармакологии, токсикологии и радиобиологии
ФГБОУ ВО «Казанская ГАВМ»**

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»
профессор Полковник Р.Х. Равилов
01.09 2020г.



**АКТ ВНЕДРЕНИЯ
результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и
технических работ**

Наименование материалов, предложенных к внедрению: материалы кандидатской диссертации Кастарновой Елены Сергеевны на тему «Разработка и клинико-терапевтическая оценка эффективности селективных препаратов»

Кем предложено: аспирантом кафедры терапии и фармакологии Кастарновой Е.С.

Где внедрено: в учебный процесс кафедры фармакологии, токсикологии и радиобиологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана».

Результаты применения: в ходе учебного процесса с представленными научно-исследовательскими данными ознакомлено 186 студентов очной и заочной формы обучения (лекции и практические занятия)

Эффективность внедрения: углубление знаний по особенностям разработки, фармакологическим терапевтическим свойствам селективных препаратов

Протокол № 1 от 01 сентября 2020 г.

Ответственный за внедрение:

Заведующий кафедрой
фармакологии, токсикологии и радиобиологии
ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия
ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»
доктор биологических наук, доцент Федотов Ф.А. Медетханов

Акт внедрения результатов научно-исследовательских работ в учебный процесс кафедры терапии и фармакологии ФГБОУ ВО «Кубанский ГАУ»

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина»



А.Г. Коцаев

2020г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технических работ

Наименование материалов, предложенных к внедрению: материалы кандидатской диссертации Кастарновой Елены Сергеевны на тему «Разработка и клинико-терапевтическая оценка эффективности селективных препаратов»

Кем предложено: аспирантом кафедры терапии и фармакологии Кастарновой Е.С.

Где внедрено: в учебный процесс кафедры терапии и фармакологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина»

Результаты применения: в ходе учебного процесса с представленными научно-исследовательскими данными ознакомлено 155 студентов очной и заочной формы обучения (лекции и лабораторно-практические занятия)

Эффективность внедрения: углубление знаний по особенности разработки, фармакологическим терапевтическим свойствам селективных препаратов

Протокол № 3 от 02 марта 2020 г.

Ответственный за внедрение:

Профессор кафедры
терапии и фармакологии
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный
аграрный университет имени И. Т. Трубилина»,
доктор ветеринарных наук

А.Х. Шантыз

Акт внедрения результатов научно-исследовательских работ в учебный процесс кафедры терапии и фармакологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский ГАУ»



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Южно-Уральский государственный аграрный университет
 Ул. Гагарина, 13, г. Троицк, Челябинская обл., Россия, 457100. Тел./факс: +7 35163-2-00-10 / 2-04-72, e-mail: tvl_t@mail.ru

ИНН 7418006770, КПП 742401001, БИК 047501001, ОГРН 1027401101530, ОКТМО 75752000, ОКПО 00493563, р/сч. 40501810565772200002
 Банк: Отделение Челябинск г. Челябинск, л/сч. 20696Х13670 в Управлении Федерального Казначейства по Челябинской области

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО Южно-Уральский ГАУ,
 кандидат экономических наук, доцент



С.В. Черепухина

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технических работ соискателя кафедры терапии и фармакологии ФГБОУ ВО Ставропольский ГАУ Кастарновой Елены Сергеевны

Материалы научно-исследовательской работы Кастарновой Елены Сергеевны на тему «Разработка и клинико-терапевтическая оценка эффективности селективных препаратов» используются в учебном процессе кафедры незаразных болезней ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный аграрный университет» при изучении дисциплины «Основы общей терапии и внутренние незаразные болезни» обучающимися очной, очно-заочной и заочной формы обучения (лекции и лабораторно-практические занятия).

Эффективность внедрения: углубление знаний по особенностям разработки, фармакологическим и терапевтическим свойствам селективных препаратов.

Результаты исследований Кастарновой Е.С. могут быть использованы при написании учебно-методических пособий.

Проректор по учебной и
 воспитательной работе

С.А. Чичиланова

Заместитель директора Института ветеринарной
 медицины по учебной работе

Д.М. Максимович

Заведующий кафедрой незаразных болезней,
 доктор ветеринарных наук, профессор

А.М. Гертман