

**ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М. ГЕРАЦИ**

ЧИТЧИЯН АЛИСА АЛЕКСАНДРОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО
И АНТИОЦИЦЕПТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ
 β -ГЛИЦИРРЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

по специальности 14.00.14 - «Фармакология»

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,

профессор М.Г. Баласанян

ЕРЕВАН-2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Перспективные направления в создании новых противовоспалительных и антиноцицептивных средств растительного происхождения	10
1.2. Фармакологическая активность β -глицирретиновой кислоты.....	24
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Методика оценки противовоспалительной активности на модели острого воспаления.....	36
2.2. Методика определения антиноцицептивной активности в тесте «Tail-flick»	38
2.3. Методика исследования ранозаживляющей активности на модели ожоговых ран .	40
2.4. Методика оценки морфологических сдвигов в пульпе зубов на модели экспериментальной гиперестезии дентина	42
2.5. Метод морфологической оценки клеточного состава слизистой оболочки полости рта и пародонта.....	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1. Исследование противовоспалительной активности β -глицирретиновой кислоты ...	47
3.2. Исследование антиноцицептивной активности β -глицирретиновой кислоты.....	55
3.3. Исследование ранозаживляющей активности 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты.....	62
3.4. Исследование влияния β -глицирретиновой кислоты на морфологические сдвиги в пульпе зубов	74

3.5. Клиническое исследование и микроскопическая характеристика патологических состояний слизистой оболочки полости рта и пародонта в динамике лечения препаратом “Ангиноваг”, содержащим β-глицирретиновую кислоту.....	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	84
ВЫВОДЫ	92
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	93

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК	арахидоновая кислота
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ГК	глюкокортикоиды
ИЛ	интерлейкины
ИПОР	исходная площадь ожоговой раны
НПВС	нестероидные противовоспалительные средства
СОПР	слизистая оболочка полости рта
АСА	ацетилсалициловая кислота
СОХ	циклооксигеназа
DMSO	диметилсульфоксид
β -GA	β -глицирретиновая кислота
HETE	гидроксиэйкозатетраенольная кислота
11 β -HSD ₂	11- β -гидроксистероид дегидрогеназа-2
iNOS	индуцируемая синтаза оксида азота
LOX	липооксигеназа
MPE	максимально возможный эффект
NAG-1	ген-1 активируемый НПВС
NF- κ B	нуклеарный фактор транскрипции
NK (TK)-R	нейрокининовые (тахикининовые) рецепторы
PLA ₂	фосфолипаза A ₂
PPAR	рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом
TNF- α	фактор некроза опухоли

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Поиск новых противовоспалительных средств с анальгетической активностью продолжает оставаться одной из важных проблем современной медицины, что диктуется растущей социальной значимостью прогрессирующих во всем мире заболеваний, сопровождающихся воспалительным процессом и сопутствующим болевым синдромом, которые, согласно международным эпидемиологическим и клиническим исследованиям, могут явиться причиной снижения работоспособности, серьезных эмоциональных нарушений и понижения уровня жизни в целом [Koenders N. et al., 2016; Котова О.В. и соавт., 2017; Chen Z. et al, 2018]. Более того, по данным ВОЗ, вследствие неадекватного лечения болевого синдрома вплоть до 64% населения периодически испытывают чувство боли, а около 45% страдают рецидивирующей или хронической болью [Медведева Л.А. и соавт., 2016]. В экономически развитых странах распространенность хронических болевых синдромов варьирует от 13,8 до 56,7%, при чем прогнозируется, что тенденция увеличения числа больных с хронической болью будет сохраняться [Рачин А.П. и соавт., 2017].

Значительный прогресс в лечении воспалительных процессов и устранения боли был достигнут после применения с указанной целью соединений двух основных групп: синтетических противовоспалительных средств стероидной и нестероидной структур [Holgado D. et al., 2018]. Особо быстрыми темпами пополняется арсенал нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), которые нашли широкое применение практически во всех областях медицины. По данным ВОЗ, около 30 млн людей в мире эпизодически или постоянно принимают НПВС, и эта цифра постоянно растет [Цурко В.В. и соавт., 2014]. Однако, несмотря на высокую эффективность, НПВС обладают множеством побочных эффектов, которые в целом встречаются примерно в каждом четвертом случае, а у 5% больных могут представлять серьезную опасность для жизни [Журавлева М.В., 2013; Vostinaru O., 2017; Wongrakpanich S. et al., 2018]. И, не случайно, что в ходе исследований, проведенных ВОЗ, ни одно из соединений группы НПВС не было признано безопасным [Simon J.P. et al., 2016; Varga Z. et al., 2017].

Сложность разработки эффективных и, в то же время, безопасных средств для лечения

воспаления [Yasuda T. et al., 2005] определяется тем, что это поливалентный процесс, этиология и патогенез которого изучены недостаточно [Punchard N.A. et al., 2004], в основе которого лежит множество альтернативных и перекрещивающихся механизмов [Perretti M., 2015; Agita A. et al., 2017]. Поэтому, влияние только на одну мишень патогенеза либо не сопровождается достаточным фармакологическим эффектом, либо вызывает развитие ряда побочных эффектов. В связи с этим особую значимость приобретает создание препаратов, комплексно воздействующих и регулирующих функциональную активность не одной, а многих молекулярных мишеней, принимающих участие в процессе воспаления [Schmid-Schonbein G.W., 2006].

В указанном плане особого внимания заслуживает критический анализ медико-социальной проблемы лекарственной полипрагмазии, обосновывающей целесообразность и необходимость разработки лекарственных средств на основе растительного сырья [Darshan S. et al., 2004]. Препараты растительного происхождения характеризуются многокомпонентным составом биологически активных соединений, соответственно, проявляют широкий спектр фармакологической активности. Сегодня многие растительные препараты представляют собой достойную альтернативу синтетическим средствам, поскольку их терапевтическая ценность доказана и научно обоснована результатами доклинических [Camacho-Barquero L. et al., 2007] и клинических исследований [Prata J. et al., 2017]. Более того, показано, что по сравнению с синтетическими препаратами, препараты природного происхождения имеют такое важное преимущество, как плавное нарастание ожидаемого воздействия с развитием сравнительно слабых побочных эффектов. При этом, несмотря на богатую историю фитотерапии, тонкие механизмы проявляемых растительными препаратами эффектов остаются не полностью выявленными. Поэтому, одним из перспективных направлений в разработке лекарств растительного происхождения признаны исследования по раскрытию механизмов действия применяемых препаратов с целью возможного расширения показаний их применения.

В связи с вышеизложенным, с целью выявления особенностей действия и исследования новых сфер применения хорошо зарекомендовавших себя лекарственных препаратов,

содержащих соединения растительного происхождения, наш выбор был остановлен на изучении особенностей фармакологического действия β -глицирретиновой кислоты (β -GA). β -глицирретиновая кислота - агликон глицирризиновой кислоты [Gumprich E. et al., 2005], который относится к пентациклическим тритерпеновым сапонинам [Augustin J.M. et al., 2011], задействованным в проявлении противовоспалительной и антиноцицептивной активности многих лекарственных растений [Okoli C.O. et al., 2007; Shah S.M.M. et al., 2014].

Возрастающий интерес к изучению β -глицирретиновой кислоты, обусловленный ее разносторонней фармакологической активностью, включающей противовоспалительное [Chang Y. L. et al., 2010; Chung Y. W. et al., 2011], антиноцицептивное [Hussain H. et al., 2018], иммуномодулирующее [Zhao X. et al., 2012], гепатопротекторное [Gumprich E. et al., 2005; Wu X. et al., 2008], противоопухолевое [Kuang P. et al., 2012], противовирусное [Fiore C. et al., 2008], антипаразитарное [Ukil A. et al., 2011], антибактериальное [Zhou X. et al., 2012] действия, способствовал созданию новых лекарственных средств, содержащих β -GA. Однако доказательная база их эффективности, раскрывающая новые механизмы с обоснованием новых перспектив их применения, практически отсутствует.

Цель и задачи исследования. Целью предпринятого исследования явилась оценка эффективности β -глицирретиновой кислоты в устранении патологических состояний, сопровождающихся воспалительным процессом и болью с выявлением возможных механизмов действия.

Для осуществления поставленной цели были выдвинуты следующие задачи:

- изучение противовоспалительного действия β -глицирретиновой кислоты на модели острого ксилолового воспаления с морфологическим подтверждением полученных данных;
- исследование антиноцицептивной активности β -глицирретиновой кислоты в тесте «Tail-flick»;
- планиметрическое исследование ранозаживляющего действия и анализ антибактериального спектра 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты на модели острого

термического ожога с рН-метрией ожоговой поверхности и оценкой цитограммы клеток раневого отделяемого;

- гистологическая оценка эффективности β -глицирретиновой кислоты при экспериментальной гиперестезии дентина;
- микроскопическая характеристика патологических состояний слизистой оболочки полости рта и пародонта в динамике лечения препаратом «Ангиноваг», содержащим β -глицирретиновую кислоту.

Научная новизна. Сравнительный анализ противовоспалительного действия и антиноцицептивной активности β -глицирретиновой кислоты показал, что исследуемые эффекты препарата сопоставимы с таковыми известных синтетических средств нестероидной природы (ацетилсалициловая кислота, диклофенак натрия, парацетамол) и позволил установить наличие центрального компонента анальгезирующего действия β -глицирретиновой кислоты.

Установлено, что в проявлении выявленного ранозаживляющего действия 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты задействована ее способность устранять сдвиги рН, подавлять рост характерных для раневой поверхности бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus mirabilis*, и стимулировать репаративную фазу раневого процесса.

Выявлено протекторное действие β -глицирретиновой кислоты, которое проявляется в ее способности стимулировать регенераторные процессы в пульпарной ткани при экспериментальной гиперестезии дентина.

Результатами клинического исследования с цитологическим подтверждением полученных данных доказано повышение эффективности лечения стоматитов, герпетических и грибковых поражений полости рта и патологий пародонта при использовании препарата «Ангиноваг», содержащего β -глицирретиновую кислоту, в сравнении с общепринятой терапией.

Научно-практическая значимость. Полученные данные о противовоспалительной, антиноцицептивной и ранозаживляющей активности β -глицирретиновой кислоты могут

явиться основой для создания новых, в том числе и комбинированных препаратов, для моно или комплексной терапии ожоговых поражений и других патологий, сопровождающихся воспалением и болью.

Результаты, подтверждающие способность 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты ингибировать экссудативную фазу воспаления, стимулировать пролиферативную фазу раневого процесса, способствуя сокращению длительности воспалительного процесса и укорочению сроков заживления раны, вместе с данными относительно способности препарата уменьшать возможное инфицирование ожоговых ран и снижать рН раневой (ожоговой) поверхности, служат обоснованием для возможного применения 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты при термическом ожоге.

Экспериментально доказанная протекторная способность β -глицирретиновой кислоты создает предпосылки для клинического применения средств, содержащих исследуемую кислоту, при гиперестезии дентина.

На основе результатов клинического исследования препарата “Ангиноваг”, содержащего β -глицирретиновую кислоту, составлен акт на его клиническую апробацию по расширению показаний в стоматологической практике, как средство для местного применения в терапии острых и хронических заболеваний слизистой оболочки полости рта.

ГЛАВА 1.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные тенденции в создании новых противовоспалительных и антиноцицептивных средств растительного происхождения

Новые достижения в изучении молекулярных механизмов развития воспалительного процесса и выявление маркеров воспаления (С-реактивный белок, цитокины, фибриноген, отношение нейтрофилов к лимфоцитам и т.д.) предопределили основные направления лекарственной коррекции процесса воспаления [Mozos I. et al., 2017].

Воспаление, представляя собой реакцию организма на внедрение патогенных факторов и повреждение тканей, проявляется участием комплекса физиологических защитных механизмов, развивающихся в ответ на указанные стимулы. Кроме того, воспалительный процесс вовлечен в патогенез и развитие многих воспалительных заболеваний, таких как астма, атеросклероз, ревматоидный артрит, ринит и т.д. [Chang Y.L. et al, 2010].

Традиционно, противовоспалительная терапия для симптоматического лечения острых и хронических заболеваний, сопровождающихся болевым синдромом, сфокусирована на стратегии снижения или нейтрализации уровня провоспалительных медиаторов и/или подавлении активности лейкоцитов. Эта терапия включает нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) [Ho K.Y. et al., 2018], агонисты глюкокортикоидных рецепторов (синтетические ГК) (рис. 1.1.), антитела или избирательные ингибиторы специфичных провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли- α (TNF- α) и интерлейкины (ИЛ).

Именно на этом принципе построена, развиваемая в последние годы, терапия одновременного форсирования множества воспалительных состояний [Duffin et al., 2009] – так называемая «pro-resolution based» стратегия, включающая воздействие на биохимические медиаторы воспаления и соответствующие сигнальные пути:

- подавление воспалительного ответа за счет снижения количества гранулоцитов, устранения вазодилатации и проницаемости сосудов;

- переключение процесса продукции провоспалительных медиаторов на продукцию противовоспалительных медиаторов;
- выключение сигнальных путей высвобождения цитокинов и активации лейкоцитов;
- апоптоз воспалительных клеток и их фагоцитоз;
- переключение фенотипа провоспалительных клеток на фенотип противовоспалительных клеток [Alessandri A.L. et al., 2013].

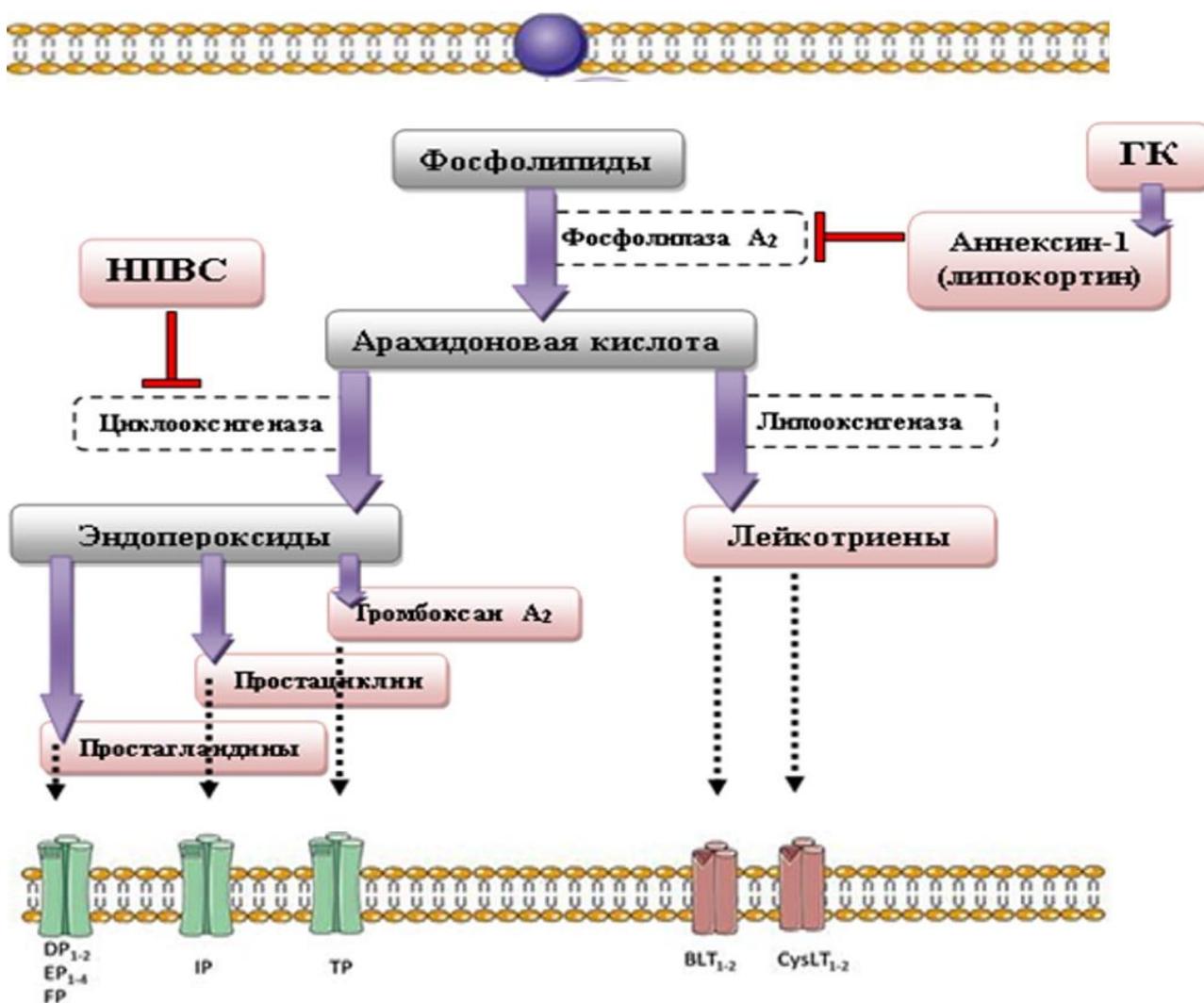


Рис. 1.1. Фармакологические мишени противовоспалительного действия НПВС (нестероидных противовоспалительных средств) и ГК (глюкокортикоидов)

Все перечисленные процессы важны для сохранности тканей после их повреждения или дисфункции. Именно на этом и основаны пути фармакологической интервенции для

коррекции процесса воспаления, основные направления и группы лекарств которых приведены на рисунке 1.2.



Рис. 1.2. Молекулярные механизмы развития воспаления и пути фармакологической коррекции (НПВС - нестероидные противовоспалительные средства, МАТ – моноклональные антитела, ЦОГ – циклооксигеназа, ЛОГ - липооксигеназа)

Несмотря на наличие большого выбора синтетических лекарственных средств для фармакотерапии острых и хронических патологий, сопровождающихся воспалением с болевым синдромом, эффективность лечения этих заболеваний довольно, о чем свидетельствуют данные исследований, проведенных ВОЗ, относительно недостаточной безопасности этих соединений [Lanas A. et al., 2009; Kandulski A. et al., 2009; Caplan A. et al., 2017].

Так, стероидные препараты, используемые для лечения воспаления, приводят к развитию ряда побочных эффектов таких как гирсутизм, синдром Кушинга, реакции гиперчувствительности, пептические язвы, гипергликемия, остеопороз и иммунодефицитные состояния [Caplan A. et al., 2017; Stout A. et al., 2019].

Применение же синтетических НПВС с анальгезирующим действием в эксперименте и клинике сопровождается развитием таких выраженных побочных эффектов и осложнений, как встречающееся в 90% случаев раздражение слизистой желудка, язвенность, кровотечения, почечная и печеночная недостаточность, интерстициальный нефрит, тромбоцитопения, гемолитическая анемия, обострения бронхиальной астмы, ангионевротический отек, тяжелые сердечно-сосудистые осложнения и т.д. [Kandulski A. et al., 2009; Harirforoosh S. et al., 2013; Marsico F. et al., 2017].

На основании вышесказанного, современная наука постулирует необходимость поиска более эффективных и малотоксичных лекарственных препаратов [Gilroy D.W. et al., 2004], содержащих комплекс активных соединений, способных одновременно воздействовать на различные звенья развития воспалительных заболеваний [Mo S.J. et al., 2007]. Этим обусловлен возрастающий интерес к лекарственным растениям, которые обладая богатым составом биологически активных соединений, являются потенциальным и относительно безопасным источником для создания новых противовоспалительных и анальгезирующих средств [Owoyele V.B. et al., 2005; Orhan I. et al., 2007].

Биологически активные соединения, извлеченные из лекарственного сырья, относятся к различным классам соединений, из которых в плане противовоспалительной и анальгетической активности особого внимания заслуживают фенольные соединения, флавоноиды, алкалоиды, гликозиды, эфирные масла, сапонины, стероиды, терпеноиды и т.д. [Feltenstein M.W. et al., 2004; Abima S.J.R. et al., 2018; Spagnuolo C. et al., 2018].

Существуют убедительные эпидемиологические и экспериментальные данные относительно того, что некоторые вещества растительного происхождения, а именно пищевые полифенолы, флавоноиды и стероиды оказывают мощное противовоспалительное и антиинфекционное действие [Gouveia M.G. et al., 2011; Chen F.F. et al., 2016; Abima S.J.R. et al., 2018]. Особого внимания заслуживает также биологическая роль и фармакологическая

активность тритерпеноидов в связи с их анальгезирующим, противовоспалительным, противоопухолевым, гепатопротективным и иммуномодулирующим эффектом [Johnson I.T. 2007; Martin R. et al., 2012; Zhang X. et al., 2019].

Фенольные соединения обладают выраженными и разнонаправленными биологическими свойствами. Полифенолы найдены во многих растительных (фрукты, овощи, травы, специи и т.д.) пищевых продуктах. Известны также фенольные соединения животного происхождения (напр., фенилаланин, эстрадиол, адреналин, тирозин, тироксин), однако их список ограничен, в то время как список фенольных соединений растительного происхождения доходит до нескольких десятков тысяч [Никитина В.С., 2016]. Установлено, что фенольные соединения, являясь активными метаболитами клеточного обмена, играют важную роль в различных физиологических процессах – фотосинтезе, дыхании, росте, а также эти вещества участвуют в механизмах защиты растений от ультрафиолетового излучения и насекомых [Никитина В. С., 2016].

Спектр биологической активности фенольных соединений очень широк. Анализ литературных данных последних лет показывает, что фенольные соединения проявляют выраженную антибактериальную [Gulcin T. et al., 2004; Doğan H.H. et al., 2013; Kurzbaum E. et al., 2019], противовирусную [Yook H.S. et al., 2010], антиагрегантную [Olas B. et al., 2002], антиоксидантную, противовоспалительную, иммуномодулирующую активности [Dvorska M. et al., 2007; Rosillo M.A. et al., 2016; Santino A. et al., 2017], а также обладают нейропротекторным [Malhotra S. et al., 2016; Renaud J. et al., 2019] и противоопухолевым [Ooi L.S. et al., 2004; Odongo G.A. et al., 2017] действиями. Исследования позволили выявить также протекторную способность некоторых фенольных соединений при повреждениях и термических поражениях кожи [Działo M. et al., 2016]. Имеются также данные о противоязвенной и гастропротективной активности некоторых полифенолов в условиях инфицирования *H. pylori*, одним из возможных механизмов которого является увеличение выделения слизи, уменьшение секреции пепсина и соляной кислоты [Nergard C.S. et al., 2005], а также ингибирование цитотоксина VacA, продуцируемого *Helicobacter Pylori*, и вызывающего повреждение эпителия желудка при развитии опухолей и пептических язв [Ruggiero P. et al., 2006].

Полифенолы можно разделить на четыре группы: флавоноиды, стилбены, лигнаны и фенольные кислоты [Ganesan K. and Xu B., 2017]. Большой интерес представляют работы, посвященные изучению противовоспалительной активности фенольных соединений, свидетельствующих о том, что все без исключения полифенолы обладают способностью подавлять процессы воспаления [Kim H.P. et al., 2004; Santos M.D. et al., 2006], которая наиболее выражена у флавоноидов и их гликозидов [Xiao J. et al., 2017; Shu J. et al., 2018]. Так, эпидемиологические исследования показали, что у индивидуумов, употребляющих продукты богатые специфическими полифенолами, намного реже наблюдается развитие воспалительных заболеваний [Yoon J.H. et al., 2005].

Фенольные соединения, как источник создания противовоспалительных препаратов, привлекли к себе большое внимание исследователей, свидетельством чего является тот факт, что около трети средств для лечения воспаления, одобренных в период между 1983-94гг. были получены из или на основе этих соединений растительного происхождения [Cragg G.M. et al., 1997]. Потребление небольшого количества полифенолов с пищей оказывает благоприятное влияние на течение хронических заболеваний у экспериментальных животных. Эпидемиологические исследования также подтвердили, что при употреблении, продуктов, богатых полифенолами регистрируется более низкая заболеваемость хроническими воспалительными патологиями [Sampson L. et al., 2002]. Эффективность некоторых пищевых фенольных соединений (в том числе ресвератрола, генистеина, катехина и индол-3-карбинола) установлена многими авторами при таких хронических заболеваниях, как воспаление и рак [Baek S.J. et al., 2002; Baek S.J. et al., 2004; Focaccetti C. et al., 2019].

Полифенолы оказывают разнообразные биологические эффекты, благодаря действию на определенные молекулярные мишени, непосредственно влияющие на воспалительный процесс. Исследователями были изучены потенциальные молекулярные механизмы противовоспалительного действия полифенолов, а именно ингибирование ферментов, связанных с воспалением, таких как циклоксигеназа (COX) или липооксигеназа (LOX); рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом (PPAR); синтазы оксида азота (NOS), нуклеарного фактора (NF)- κ B и ген-1, активируемый НПВС (NAG-1) [Yahfoufi N. et al., 2018]. По-существу, полифенолы оказывают влияние на многие механизмы развития

воспаления, среди которых выделяют механизм, связанный с арахидоновой кислотой (АК) — АК-зависимый путь (ингибирование COX, LOX и PLA₂) и механизм, не связанный с арахидоновой кислотой - АК-независимый путь (ингибирование NOS, NF-κB, PPAR, и NAG-1). Этим обусловлено широкое применение растительных полифенолов в качестве эффективных средств для предотвращения и лечения воспалительного процесса с сопутствующим болевым синдромом, которые в данном аспекте могут конкурировать с синтетическими препаратами. Кроме того, растительные полифенолы могут служить потенциальной основой для разработки новых более эффективных препаратов [Ganesan K. and Xu B., 2017].

Наиболее распространенная группа растительных фенолов – это флавоноиды. Структурно флавоноиды состоят из двух ароматических колец, связанных между собой тремя атомами углерода [Harborne J.B., 2000; Cheynier V., 2005]. Известно более 4000 флавоноидов. Общепринятая классификация флавоноидов предусматривает их деление на 10 основных классов, исходя из степени окисленности трехуглеродного фрагмента [Tsao R., 2010]:

- катехины (флаван-3-олы, производные флавана — катехины, эпикатехин)
- лейкоантоцианидины или проантоцианиды (флаван-3,4-диолы - лейкоцианидин)
- антоцианы и антоцианидины (пеларгонидин, дельфинидин)
- флаваноны (гесперидин и нарингенин)
- флавононолы (таксифолин)
- флавоны (апигенин, лютеолин, хризин) и изофлавоны
- флавонолы (кемпферол, кверцетин, мирицетин, изорамнетин)
- халконы (изоликверитингенин) и дигидрохалконы
- ауроны (сульфуротен, лептозидин)
- бифлавоноиды (окнафлаван, аментофлаван, гинкгетин, изогинкгетин)

Флавонолы, флавоны, изофлавоны, антоцианы чаще встречаются в виде гликозидов. Различные вариации флавоноидов связаны между собой общим биосинтезом [Tsao R. and McCallum J., 2009; Panche A.N. et al., 2016] (рис. 1.3.).

Многообразием производных флавоноидных соединений и предопределен широкий спектр их фармакологической активности - спазмолитической [Ragone M.I. et al., 2007], антимикробной [Rattanachaikunsopon P. et al., 2007], седативной [Aguirre-Hernandez E. et al., 2007], противоязвенной [Sannomiya M. et al., 2005], антипиретической [Yonga Z. et al., 2005], нейропротективной [Nakajima A. et al., 2007], противоопухолевой [Hou D.X. et al., 2004], антитромботической [El Naouari M. et al., 2007] и антиоксидантной [Heneman K.M. et al., 2007]. Особого внимания заслуживают их противовоспалительная и антиинфицирующая активности, наличие которых было доказано многочисленными исследованиями на животных в различных экспериментальных моделях [Owoyele V.B. et al., 2005; Borgi W. et al., 2007].

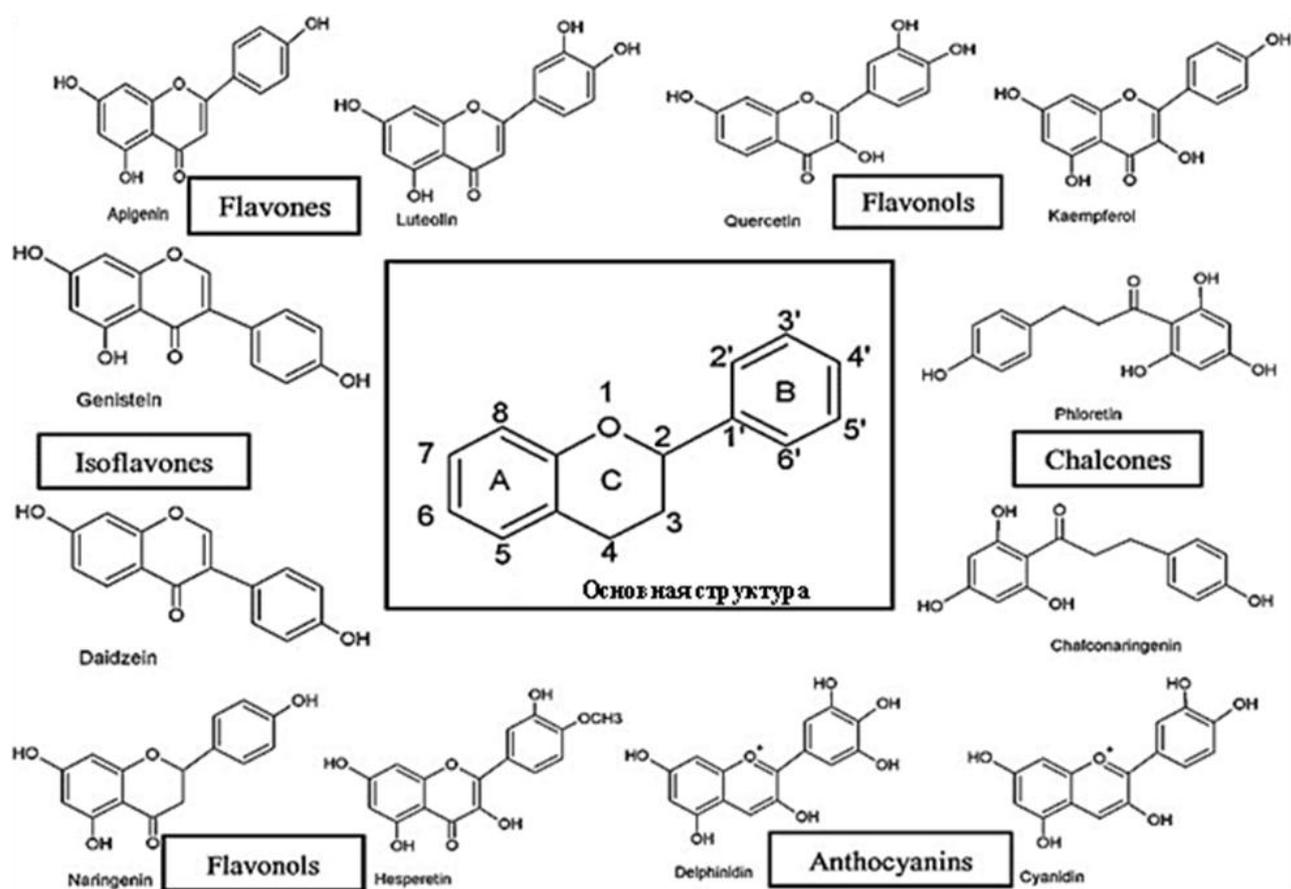


Рис. 1.3. Основная структура флавоноидов и их классы

Причем, изучение механизмов действия флавоноидов показало, что проявление указанных эффектов обусловлено одновременным воздействием на различные мишени воспалительного процесса [Panche A.N. et al., 2016] (рис. 1.4.).

Фибробласты и ПВМ *	Протеины плазмы	Эндотелиальные клетки *	Полиморфоядерные лейкоциты *
-Восстановление	-Комплемент: медиаторы воспаления и элиминация микробов	-Источник медиаторов воспаления (цитокины, оксид азота и др.)	-Элиминация микробов и погибших тканей -Источник медиаторов воспаления
Моноциты	Лимфоциты	Тучные клетки *	Макрофаги *
-Взаимодействие с макрофагами	-Иммунный ответ и источник цитокинов	-Источник медиаторов воспаления (гистамин и др.)	-Элиминация микробов и погибших тканей -Источник медиаторов воспаления

Рис. 1.4. Тканевой ответ на воспаление и точки приложения (*) действия флавоноидов

➤ **СОХ - ингибирование**

Противовоспалительный эффект полифенолов, как показано, развивается при ингибировании фермента циклооксигеназы (СОХ), в результате подавления образования простагландинов и тромбоксана А₂ из арахидоновой кислоты. Baumann и соавт. были первыми, которые исследовали, что некоторые растительные полифенолы (флаван, хризин), которые ежедневно потребляются в различных продуктах, могут выступать в роли альтернативных средств для лечения воспалительных заболеваний, выступая в качестве ингибиторов СОХ [Азарова О.В. и Галактионова Л.П., 2012]. Причем, некоторые исследователи сообщают, что многие растительные полифенолы способны ингибировать СОХ как на уровне ферментативной активности, так и на уровне транскрипции [Chi Y.S. et al., 2001]. Хотя и многими исследованиями доказана способность полифенолов ингибировать СОХ-1 или СОХ-2, однако убедительные данные о действии полифенолов на СОХ-3 пока отсутствуют [Yoon J.H. et al., 2005].

СОХ-ингибирующая активность флавоноидов в человеческих тромбоцитах впервые была обнаружена у лютеолина, 3,4-дигидрофлавона, галангина и морина [Kim H.P. et al.,

2004]. Согласно данным других исследователей, некоторые агликоны гликозидов флавоноидов, например, кемпферол и кверцетин, в экспериментах проявляют выраженную СОХ-ингибирующую активность [Азарова О.В. и Галактионова Л.П., 2012].

Попытки обнаружения среди флавоноидов селективных блокаторов СОХ-2 привели к установлению умеренной СОХ-2 блокирующей активности у кверцетина [Xiao X. et al., 2011] и некоторых пренилированных флавоноидов (морусин, куванон) [Chi Y.S. et al., 2001]. Кроме того, умеренная СОХ-2 ингибирующая активность была установлена также у сангенона и казинола [Kim H.P. et al., 2004]. Представленные данные свидетельствуют о том, что попытки обнаружения высокоселективных блокаторов СОХ-2 среди флавоноидов долгое время оставались безуспешными. Лишь в 2001 году был обнаружен первый селективный блокатор СОХ-2 - вогонин [Chi Y.S. et al., 2001].

➤ **LOX ингибирование**

Липооксигеназа (LOX) является ферментом, ответственным за образование гидроксикислот и лейкотриенов (LT) в каскаде арахидоновой кислоты. Существуют различные изоферменты LOX, которые в зависимости от локализации оказывают различное влияние на различные клетки и ткани. Изофермент 15-LOX приводит к синтезу 15-гидроксиэйкозатетраенольной кислоты (15-НЕТЕ), проявляющей противовоспалительную активность [Mashima R. and Okuyama T., 2015]:

- 5-LOX и 12-LOX провоцирует развитие воспалительных и аллергических заболеваний.
- 5-LOX приводит к продукции 5-НЕТЕ и LT-A₄, LT-B₄, являющихся мощными хемоаттрактантами и LT-C₄, LT-D₄ и LT-E₄, известные как медленно реагирующие субстанции анафилаксии (МРС-А), участвуют в проявлении анафилактического синдрома.
- 12-LOX приводит к синтезу 12-НЕТЕ, стимулирующую агрегацию тромбоцитов и вызывающую развитие воспалительных реакций.

Таким образом, как видно, именно влияние полифенолов на активность 5- и 12-LOXs важно для развития противовоспалительного эффекта [Chi Y.S. et al., 2001; Mashima R. and Okuyama T., 2015]. Установлено, что сильными блокаторами ферментов 5-LOX и 12-LOX являются флавонолы (кемпферол, кверцетин и т.д.) [Borbulevych O.Y. et al., 2004].

➤ **Сочетанное ингибирование COX и LOX**

Известно, что при блокировании только COX-2 каскад арахидоновой кислоты направляется по липооксигеназному пути, который приводит к продукции мощных медиаторов воспаления, при этом формирование лейкотриенов даже может ускориться. В связи с этим становится очевидно, что двойное ингибирование LOX и COX является логичным подходом в разработке новых эффективных лекарств для борьбы с воспалением и болевым синдромом при возможно слабых проявлениях побочных эффектов. Это особенно важно в том плане, что по мнению некоторых исследователей селективное ингибирование COX-2 может увеличить риск сердечнососудистых осложнений [Gunter B.R. et al., 2017]. Было установлено, что многие полифенолы, такие как, куркумин, являются ингибиторами как COX, так и LOX [Bengmark S., 2006].

➤ **Ингибирование фосфолипазы A₂ (PLA₂)**

Исследователями было установлено, что некоторые полифенолы (кверцетин, кемпферол, скутеларин) способны ингибировать PLA₂ [Lättig J. et al., 2007], что в настоящее время рассматривается как потенциальное терапевтическое направление в создании новых средств для лечения воспалительных заболеваний [Six D.A. et al., 2000].

Первым обнаруженным флавоноидом, ингибирующим активность PLA₂ нейтрофилов человека, является кверцетин [Kim H.P. et al., 2004], дальнейшие исследования показали, что более мощными блокаторами PLA₂ являются кверцетин, кемпферол и галангин [Lättig J. et al., 2007].

➤ **Рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом (PPARs)**

Продукция многих воспалительных цитокинов регулируется на уровне транскрипции, в результате чего стимулируется, либо подавляется воспалительный процесс. Одним из связующих звеньев между провоспалительными цитокинами и фактором транскрипции являются PPARs. PPARs – являются нуклеарными рецепторами, активирующимися под воздействием экзогенных и эндогенных лигандов [Li J. et al., 2018]. Были выявлены три подтипа этих рецепторов (α , β/δ и γ), которые кодируются отдельными генами. PPAR α несет ответственность за эффекты, связанные с пролиферацией пероксисом такие, как индукция ферментов, пролиферация клеток печени и противовоспалительное действие [Klaunig J.E. et

al., 2003]. PPAR α также играет важную роль в регуляции клеточного обмена и β -окисления жирных кислот [Poulsen L.L.C. et al, 2012]. PPAR δ (либо PPAR β) широко распространены в головном мозге, толстом кишечнике и коже. Влияние PPAR δ на процесс воспаления мало изучено, все изоформы PPAR регулируют клеточную дифференциацию [Poulsen L.L.C. et al, 2012], апоптоз [Yoshizawa K. et al., 2002], липидный обмен и развитие метаболических заболеваний. Ряд авторов предполагают, что PPAR-лиганды ингибируют образование провоспалительных цитокинов в моноцитах. Таким образом, активация PPAR может быть перспективным направлением в борьбе с воспалением [Li J. et al., 2018].

Исследования показали, что полифенолы также могут влиять на экспрессию PPAR, приводя к их активации [Kaul D. et al., 2004]. Следует отметить, что PPAR тесно связаны с другими механизмами развития воспалительного процесса, включая NF- κ B, экспрессию COX-2 и образование провоспалительных цитокинов. Результаты представленных исследований свидетельствуют о том, что активация PPARs определенными полифенолами представляют новую возможность для лечения хронических воспалительных заболеваний с болевым синдромом.

➤ **Синтазы оксида азота (NOS)**

После установления факта об участии оксида азота (NO) в воспалительных реакциях организма, путем непосредственного воздействия на активность COX-2, или посредством увеличения количества пероксинитрит радикала [Rawlingson A., 2003], большое количество исследований было посвящено изучению влияния полифенолов и флавоноидов на активность NOS, принимая во внимание непосредственное участие индуцируемой синтазы оксида азота (i-NOS) в развитии воспалительного процесса, включая потенцирующее действие на другие медиаторы воспаления. При этом, было установлено, что из большого числа флавоноидов лишь немногие, при этом только в высоких концентрациях, действуют на активность n-NOS и i-NOS [Chen Y.C. et al., 2001].

➤ **Нуклеарный фактор транскрипции (NF- κ B)**

Под влиянием различных стимуляторов воспаления (свободных радикалов, индукторов воспаления, цитокинов, канцерогенов, эндотоксинов, γ -излучения, ультрафиолетового излучения и рентгеновских лучей) активируется клеточный киназный комплекс (IKK α/β),

который фосфорилируя I κ B, способствует активации NF- κ B и его транслокации в клеточное ядро. После активации NF- κ B индуцирует экспрессию более 200 генов, которые подавляют апоптоз и вызывают клеточную трансформацию, пролиферацию, инвазию, метастазирование, химиорезистентность, радиорезистентность и воспаление [Lawrence T., 2009]. Активированная форма NF- κ B выступает в качестве посредника при раке, атеросклерозе, инфаркте миокарда, сахарном диабете, аллергии, астме, артрите и других воспалительных заболеваниях. Не удивительно, что NF- κ B связан с широким спектром заболеваний, поскольку большинство заболеваний сопровождаются воспалительным процессом. Становится очевидным, что средства, подавляющие активацию NF- κ B будут потенциально эффективны в предотвращении и лечении воспалительных заболеваний.

Некоторые полифенолы (кварцетин) оказывают противовоспалительное действие путем ингибирования NF- κ B [Kieckow C.J. et al., 2016].

➤ **Ген-1, активируемый НПВС (NAG-1)**

Индукция NAG-1 со стороны НПВС является важным COX-независимым механизмом, посредством которого определенные противовоспалительные соединения осуществляют свое действие [Baek S.J. et al., 2002]. NAG-1 обладает разносторонними биологическими функциями, что предполагает значительный вклад этого протеина в развитии воспаления, опухолевого процесса и дифференциации клеток. Молекулярные механизмы, ответственные за эти функции еще предстоит определить в деталях. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что NAG-1 может относиться к семейству некоторых цитокинов типа TGF- β (трансформирующий ростовой фактор- β), который вызывает апоптоз и подавление роста эпителиальных клеток. Кроме того, экспрессия NAG-1 приводит к снижению секреции TNF- α макрофагов, вызывает апоптоз некоторых раковых клеток [Kang S.U. et al., 2012]. В отличие от других представителей семейства TGF- β , NAG-1 индуцируется не только НПВС-ми, но и некоторыми полифенолами (ресвератол, катехины) [Yoon J.H. et al., 2005]. В целом, NAG-1 является оправданной молекулярной мишенью для изучения противовоспалительной и/или противоопухолевой активности различных соединений.

Кроме указанных механизмов в проявлении противовоспалительного эффекта флавоноидов задействованы также их антиоксидантная и сквенджерная способности

[Miliauskas G. et al., 2004]. Флавоноиды меняют клеточную активность провоспалительных клеток: макрофагов, лимфоцитов, тучных клеток и нейтрофилов. В частности, некоторые флавоноиды ингибируют выделение гистамина из тучных клеток, другие пролиферацию Т-лимфоцитов [Kim H.P. et al., 2004]. Кроме того, установлено, что некоторые флавоноиды (физетин, проонтоцианиды), снижают продукцию цитокинов, таких как TNF- α , IL-4, IL-13 и IL-5 [Garbacki N. et al., 2004], приводят к уменьшению клинических проявлений воспалительных и аллергических заболеваний. Согласно данным Wheeler и соавторов, возможным механизмом указанной противовоспалительной активности флавоноидов (катехины, генистеин, силибин) является снижение экспрессии генов различных провоспалительных молекул [Wheeler D.S. et al., 2004].

Таким образом, растительные полифенолы и флавоноиды включают широкий спектр биологически активных соединений, которые широко распространены в различных растениях, многие из которых были использованы в традиционной восточной медицине в течение тысяч лет, однако раскрытие молекулярных механизмов их противовоспалительного действия открыли новые перспективы для создания на их основе более эффективных и безопасных профилактических и лечебных средств.

В указанном аспекте также особого внимания заслуживают стероиды, среди которых выделяют собственно стероиды (производные циклопентанпергидрофенантрена) и тритерпены – продукт циклизации шести изопреновых остатков в тетра- или пентациклические структуры. Большинство стероидов, присоединяя гидроксил в разных позициях молекулы, образуют спирты - *стеролы* (фитостеролы). Гликозиды стеролов, как известно, это сапонины, состоящие из агликонов (сапогенинов) и углеводной части. В зависимости от строения сапогенина различают стероидные и тритерпеновые сапонины.

Наиболее изученным представителем стероидных сапонинов является β -ситостерол, впервые выделенный из кактуса. Было выявлено, что метанольный экстракт кактуса обладает выраженной противовоспалительной активностью. Дальнейшее изучение механизмов его противовоспалительной активности показало, что действие указанного соединения сравнимо с гидрокортизоном. При этом согласно Delporte С., в механизмах противовоспалительного действия стероидов задействовано ингибирование синтеза LT-ов, а также снижение

активности фосфолипазы С и уменьшение миграции лейкоцитов в зону воспаления [Delporte C. et al., 2005].

Литературные данные указывают на наличие выраженной противовоспалительной и антиноцицептивной активности у пентациклических тритерпеновых сапонинов и их гликозидов [Sayyah M. et al., 2004], в результате их воздействия на P_g-ую систему [Huss U. et al., 2002], а также антибактериальной активности [Pisteli L. et al., 2002] и гастропротективного действия [Jorge R.M. et al., 2004]. Более того, имеются данные относительно антиканцерогенной активности некоторых сапонинов, в частности β-ситостерола [Park C. et al., 2007]. Имеются также данные о противоязвенной активности тритерпеноидов, которая обусловлена их гастропротективным действием [Jorge R.M. et al., 2004].

Детальный анализ противовоспалительной активности растительных стеролов показал, что большинство их (β-ситостерол и др.) проявляют выраженную скавенджерную активность [Perazzo F.F. et al., 2005; Torcu G. et al., 2007]. Эти данные подтвердились использованием растительных стероидов в фитотерапии патологий, сопровождающихся воспалительным процессом, поскольку согласно Cuzzocrea S. [Cuzzocrea S. et al., 2001] антиоксидантная терапия является одним из важных подходов в комплексной терапии воспалительных процессов [Chomnawang M.T. et al., 2007].

В указанном плане особый интерес представляют пентациклические тритерпеновые сапонины [Augustin J.M. et al., 2011], содержащиеся в различных растениях, из которых особого внимания заслуживает β-глицирретиновая кислота, которая является агликоном глицирризиновой кислоты [Gumpricht E. et al., 2005], последнюю получают из солодки голой [Kalaiarasi P. et al., 2009].

1.2. Фармакологическая активность β-глицирретиновой кислоты

Внедрение и широкое применение в современной медицине лекарств на основе растительного сырья, в качестве химиопрофилактических и терапевтических средств [Darshan S. et al., 2004;] зачастую лимитируется ограничением научного обоснования

относительно эффективности этих препаратов в связи с недостаточным изучением механизмов их действия.

Одним из таких соединений является β -глицирретиновая кислота (β -GA) - продукт гидролиза глицирризиновой кислоты, содержащейся в корнях солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) [Chandler R.F., 1985]. В корнях солодки содержатся довольно разнообразные биологически активные компоненты, включая тритерпеновые сапонины, флавоноиды, изофлавоноиды, полисахариды, кумарины, стеролы, фитоэстрогены, витамины, минералы, аминокислоты и т. д. [Asl M.N. and Hosseinzadeh H., 2008; H. Zhang Q. et al., 2009; Lee Y.S. et al., 2010]. Среди последних, особого внимания заслуживают пентациклические тритерпеновые сапонины [Augustin J.M. et al., 2011] представителем которых и является β -GA - агликон глицирризиновой кислоты [Gumpricht E. et al., 2005]. В последние годы интерес исследователей к β -GA повышается, поскольку накопленные литературные данные свидетельствуют о высокой и разносторонней активности β -GA.

При пероральном применении глицирризиновая кислота метаболизируется в β -GA под действием кишечных бактерий, содержащих β -D-глюкуронидазу [Kim D.H. et al., 2000]. При внутривенном введении глицирризиновая кислота метаболизируется в печени лизосомальной β -D-глюкуронидазой в 3-моноглюкуронид-глицирретиновой кислоты (рис. 1.5.). Этот метаболит экскретируется с желчью в кишечник, где метаболизируется бактериями в β -GA, последняя может подвергаться реабсорбции [Ploeger B. et al., 2001].

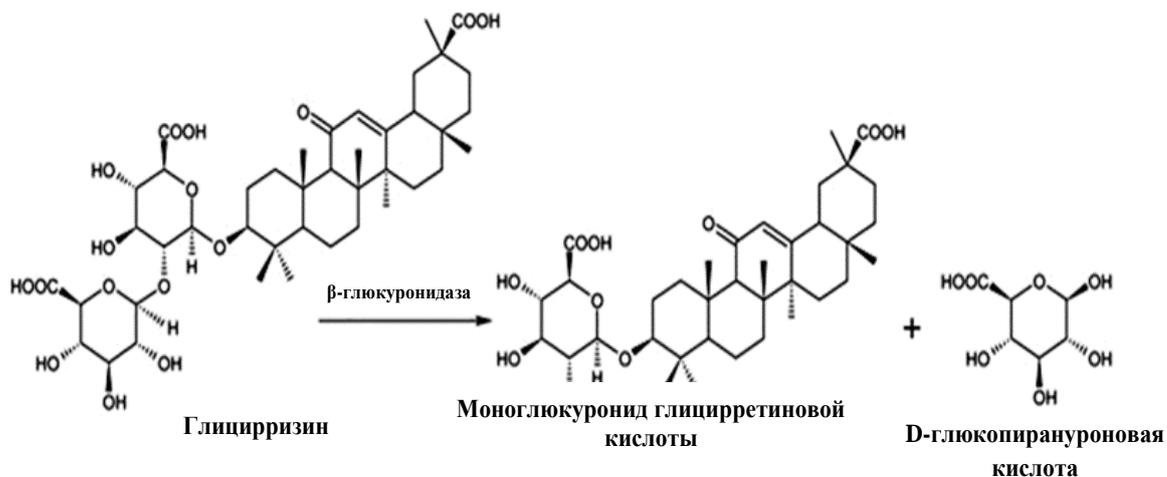


Рис. 1.5. Гидролиз глицирризиновой кислоты в присутствии β -D-глюкуронидазы с образованием β -глицирретиновой кислоты

Широкий спектр фармакологической активности β -ГА включает: антиноцицептивное [Akasaka Y. et al., 2011], противовоспалительное [Schrofelbauer B. et al., 2009; Kao T.C. et al., 2010], иммуномодулирующее [Hendricks J.M. et al., 2012], противовирусное [Fiore C. et al. 2008], антиаллергическое [Park H. et al., 2004], противоопухолевое и проапоптотическое [Hibasami H. et al., 2006; Yang J.C. et al., 2012], гепатопротективное [Wu X. et al., 2008], антибактериальное и противопаразитарное [Maatooq G.T. et al., 2010; Ukil A. et al., 2011] действия. Кроме того, данные клинических наблюдений показывают, что β -ГА способна влиять на метаболизм глюкокортикоидов (ГК) [Vanuum S.H.M. et al., 2012], активность интерферона [Abe N. et al., 1982], стимулировать липолиз [Moon M.H. et al., 2012] и т. д.

➤ **Противовоспалительное действие β -ГА**

Исследование **противовоспалительного действия** β -ГА показало, что оно реализуется при участии ряда механизмов:

- **подавление метаболизма глюкокортикоидов** и потенцирование их эффектов, что подтверждается повышением эффективности лечения при комбинированном применении β -ГА с ГК [Hu G. et al., 2008]. Авторы объясняют это способностью β -ГА ингибировать печеночную и почечную 11β -гидроксистероид дегидрогеназу-2 (11β -HSD₂), которая быстро метаболизирует активный кортизол в неактивный кортизон [Vanuum S.H.M. et al., 2012], в результате чего происходит куммулирование ГК, которые, как известно, обладают выраженным противовоспалительным действием. Stan H. M. и др. утверждают, что после применения β -ГА повышаются уровни кортизола в плазме, слюне и почках [Vanuum S.H.M. et al., 2012]. Однако длительное ингибирование 11β -HSD₂ может привести к гипертензии, вследствие вазоконстрикции и избыточной ретенции натрия, что можно объяснить кортизол-зависимой активацией минералокортикоидных и глюкокортикоидных рецепторов [Bailey M.A. et al., 1991; Ferrari P. 2010]. Сама β -ГА обладает весьма слабым аффинитетом к минералокортикоидным и глюкокортикоидным рецепторам, и ее эффекты обусловлены лишь ингибированием 11β -HSD₂ [Hu G. et al., 2008].

- **антиоксидантная активность**, которой ряд авторов интерпретируют способность β -GA снижать резистентность к лечению ГК (т. к. часто резистентность к ГК вызывается реактивными формами кислорода) и активировать различные факторы транскрипции, напр., протеин-активатор-1, нуклеарный фактор активации Т-клеток (AP-1, NFAT) и т.д. В связи с этим β -GA применяется при резистентности к стероидному лечению, что является серьезной клинической проблемой, требующей дополнительной терапии [Kao T.C. et al., 2012].
- **снижение продукции оксида азота (NO) и простагландина E_2** индуцированных микробными липополисахаридами, с повышением активностей iNOS, PLA₂ и COX-2 в макрофагах [Jeong H.G. et al., 2002; Tsao L.T. et al., 2005]. Подтверждением подавляющего действия β -GA на продукцию NO является ее способность ингибировать эндотелий-зависимую релаксацию сосудов в эксперименте [H. Fukuta et al., 1999]. Так как транскрипция iNOS находится под контролем NF- κ B, было исследовано влияние β -GA на процесс активации указанного фактора, при этом было установлено, что β -GA дозозависимо подавляет фосфорилирование провоспалительного фактора - NF- κ B [Chang Y.L. et al., 2010; Sasaki H. et al., 2010], тем самым предотвращая его активацию. Последний играет важную роль в развитии иммунного ответа и острой фазы воспаления, в частности в NF- κ B-зависимой продукции цитокинов воспаления [Jeong J.B. et al., 2010].
- **понижение экспрессии медиаторов воспаления**, таких как гистамин [Tsukahara M. et al., 2005].
- **подавление образования провоспалительных цитокинов**, таких как интерлейкин-5, интерлейкин-6, интерлейкин-13, интерлейкин-17, TNF- α , интерферон-гамма (IFN- γ) и повышение экспрессии противовоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-10 и трансформирующий ростовой фактор- β (TGF- β) [Kang O.H. et al., 2005; Di Paola R. et al., 2009; Kim S.H. et al., 2017; Su L. et al., 2018].
- **ингибирование классического и альтернативного путей активации комплемента** с преимущественным влиянием на его C₃ компонент, что особенно проявляется при длительном применении β -GA [Kroes B.H. et al., 1997].

При сравнительной характеристике противовоспалительного действия α и β стереоизомеров GA, было установлено что α -GA обладает более сильным противовоспалительным эффектом, однако содержится в солодке в очень малых количествах, кроме того процесс извлечения довольно сложный и трудоемкий. Интересно отметить, что α -GA селективным ингибирующим влиянием на 11 β -гидроксистероид дегидрогеназу-1, в отличие от β -GA, которая подавляет обе формы фермента [Classen-Houben D. et al., 2009].

➤ **Противоаллергическое действие β -GA**

В связи с недостаточной эффективностью имеющихся в настоящее время средств для лечения хронических аллергических дерматитов (ГК, НПВС, иммуносупрессоры) большой интерес представляет выявленное противоаллергическое действие β -GA, причем наиболее эффективно ее местное применение, во избежание системных осложнений. Marsella R. и соавт. установили, что аппликации β -GA могут эффективно применяться для лечения различных поражений кожи, в том числе аллергических дерматозов [Marsella R. et al., 2017], а также для предотвращения развития хронического контактного дерматита и часто наблюдающегося при этом зуда [Shin Y.W. et al., 2017]. Антиаллергический эффект β -GA связан именно с выраженным и дозозависимым подавлением эффектов, опосредованных субстанцией P и рецепторами активируемыми протеазами (PAR-2), которые также участвуют в механизме развития зуда [Akasaka Y. et al., 2011]. Таким образом, β -GA и некоторые ее производные подавляют развитие аллергических реакций и могут быть использованы в качестве новых антиаллергических препаратов [Park H. et al., 2004].

➤ **Иммуномодулирующее действие β -GA**

Подтверждением иммуномодулирующего действия β -GA является ее способность стимулировать рецепторы макрофагов и вызывать выраженную дозозависимую экспрессию Толл-подобных рецепторов (TLRs), с превалирующим влиянием на подтип TLR-4, которые представляют собой класс белков, играющих ключевую роль в системе врожденного и адаптивного иммунитета [Peng L.N. et al., 2011].

В пользу иммуномодулирующего действия β -GA свидетельствуют данные о ее способности индуцировать интерферон и повышать активность клеток-киллеров, а также

выражено стимулировать пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, повышая концентрацию иммуноглобулинов [Abe N. et al., 1982]. При пероральном применении β -ГА наблюдалось индуцирование гуморального и клеточного иммунитета, а именно модуляция субпопуляций лимфоцитарных клеток, таких как В-(CD19⁺) и Т-(CD4⁺ и CD8⁺) [Hendricks J.M. et al., 2012].

➤ **Антибактериальные свойства β -ГА**

Экспериментально доказано, что β -ГА и ее производные проявляют антибактериальные свойства по отношению к различным патогенным агентам как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo* [Pellati D. et al., 2009; Maatooq G.T. et al., 2010]. При этом, молекулярные механизмы антибактериального действия β -ГА остаются не полностью изученными. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют об участии многих механизмов в проявлении антибактериального действия β -ГА, включая:

- повышение продукции NO, который, как известно, обладает цитотоксическими свойствами и используется клетками-киллерами иммунной системы для уничтожения бактерий и клеток злокачественных опухолей [Jeong H.G. et al., 2002].
- модуляция стрессорного ответа клеток по отношению к различным инфекционным возбудителям при хронических инфекционных воспалительных процессах [Hendricks J.M. et al., 2012].
- бактерицидный эффект β -ГА, в частности по отношению к метициллин-резистентному золотистому стафилококку (MRSA) в условиях *in vitro*. Обнаружено также, что β -ГА *in vivo* уменьшает размер повреждения при поражении кожи *Staphylococcus aureus*, а также понижает экспрессию факторов вирулентности стафилококков в условиях *in vivo* и *in vitro* [Long D.R. et al., 2013].
- антипаразитарную активность, которая экспериментально доказана при внутрибрюшинном введении β -ГА мышам в модели висцерального лейшманиоза [Ukil A. et al., 2005], возбудителем которого является *Leishmania donovani*, при котором наблюдается полная эррадикация паразита [Ukil A. et al., 2011]. Более того показана антилейшманиозное действие β -ГА [Ukil A. et al., 2005], что интерпретируется ее иммуномодулирующей способностью, связанной с NF- κ B опосредованной [Jeong H.G. et al.,

2002] экспрессией iNOS и NO-продукцией. Приведенные данные особо важны, если учесть, что существующие в настоящее время препараты для лечения лейшманиоза (амфотерицин В, пентамидин) требуют длительного курса лечения и вызывают развитие серьезных побочных эффектов, что лимитирует их клиническое применение [Guerin P.J. et al., 2002].

- влияние на периодонтопатогенные и капнофильные бактерии, что позволило применение β -ГА в составе зубных паст и эликсиров. При этом, экспериментальные данные относительно бактерицидного действия β -ГА на указанные типы бактерий, открывают перспективы применения ее в качестве эффективного средства в комплексной терапии периодонтита [Salari M.H. et al., 2003].
- противомикробную активность против *Staphylococcus aureus*. Было установлено, что β -ГА обладает дозозависимым действием на выработку стафилококками человеческого лейкоцитарного антигена (Hla) при *Staphylococcus aureus*-индуцированной пневмонии. Хотя и β -ГА не ингибирует рост *Staphylococcus aureus*, однако, даже низкие концентрации этой кислоты могут значительно понизить секрецию Hla *Staphylococcus aureus*. При этом авторы утверждают, что β -ГА можно использовать как в качестве монотерапии, так и в комбинации с другими антибиотиками [Li H.E. et al., 2012]. Так, даже подкожное введение β -ГА снижает выраженность легочных патологий, связанных с стафилококковой инфекцией [Li H.E. et al., 2012].
- антимикобактериальную активностью против *Mycobacterium bovis*, которая являясь причиной туберкулеза в 7-10% случаев, обладает выраженной устойчивостью к лекарствам. Кроме того, β -ГА проявляет синергентный эффект при применении с препаратами первого ряда для лечения туберкулеза, такими как изониазид, рифампицин и стрептомицин, включая действие на резистентные штаммы [Zhou X. et al., 2012].

➤ **Противовирусная активность β -ГА**

Особого внимания заслуживает противовирусная активность β -ГА, которая обусловлена ее способностью подавлять репликацию ДНК и РНК вирусов [Fiore C. et al., 2008]. Другим механизмом противовирусного действия β -ГА является модулирование

противовирусного иммунного ответа путем индуцирования экспрессии интерферона, приводящее к включению множества сигнальных путей, например, начинающегося с TLR-рецепторов [Garcia-Sastre A. et al., 2006].

При применении β -GA у мышей с моделью ротавирусной инфекции, наблюдается уменьшение секреции вируса, кроме того, плазменный титр противовирусных антител у животных, обработанных β -GA, намного выше и при добавлении β -GA к клеточной культуре подавляется ротавирусная инфекция посредством ингибирования репликации вируса [Hardy M.E. et al., 2012].

➤ **Противоопухолевое и проапоптотическое действия β -GA**

Широкий спектр фармакологической активности β -GA включает, также, противоопухолевое и проапоптотическое действия [Hibasami H. et al., 2006; Yang J.C. et al., 2012], которые включают:

- ингибирование туморогенеза и индукцию апоптоза различных опухолевых клеток таких, как HL-60 клетки (промиелоцитарный клеточный лейкоз), раковые клетки желудка человека, раковые клетки грудной железы и клетки гепатомы [Hibasami H. et al., 2006].
- цитотоксическое действие β -GA и ее производных в отношении раковых клеток поджелудочной железы [Jutooru I. et al., 2009].
- потенцирование β -GA в высоких дозах действие химиотерапевтических средств при опухоли шейки матки на клетки линии SiHa [Lee C.S. et al., 2008]. β -GA обладая токсическим влиянием по отношению к опухолевым клеткам шейки матки - SiHa, применяется в синергентной терапии с другими противоопухолевыми препаратами и значительно повышает эффективность лечения [Lee C.S. et al., 2008].

Причем, установлено, что β -GA по сравнению с другими известными тритерпеновыми кислотами обладает более выраженным противоопухолевым действием при наличии низкой цитотоксичности по отношению к нормальным клеткам, проявляя селективность по отношению к опухолевым клеткам [Zuco V. et al., 2002]. Селективная токсичность β -GA особенно проявляется по отношению к онкогенным клеткам [Yamaguch H. et al., 2011]. Приведенные утверждения подтверждаются способностью β -GA ингибировать 11β HSD₂,

которая экспрессируется в различных опухолях и ассоциирована с гипофизарной аденомой, колоректальными опухолями и опухолями грудной железы и др. Более того существуют данные о стимулировании β -GA и ее производными проапоптотического пути гибели различных опухолевых клеток, в результате нарушения функции мембран митохондрий с повышением их проницаемости и гибелью митохондрий, что является ведущим звеном в процессе индукции апоптоза опухолевых клеток [Luo H. et al., 2004; Lee C.S. et al., 2008; Schwarz S. et al., 2010]. Так, в эксперименте на изолированных митохондриях печени β -GA в присутствии ионов Ca^{2+} приводит к набуханию митохондрий, снижению мембранного потенциала в опухолевых клетках (напр., SiHa-клетках) и секреции цитохрома-С с активированием каспазы-3 [Lee C.S. et al., 2008], играющих важную роль в процессах апоптоза, некроза и воспаления. Кроме того, β -GA уменьшает продукцию PGE_2 в опухолях, тем самым предотвращается формирование, рост и метастазирование опухоли [Zhang M.Z. et al., 2009].

- стимулирование апоптоза β -GA в инфицированных вирусом герпеса-В лимфоцитах при саркоме Капоши [Curreli F. et al., 2005].
- ингибирующий эффект β -GA на пролиферацию MCF-7 клеток, без ощутимого воздействия на нормальные эпителиальные клетки грудной железы - MCF-10A. Авторами было доказано, что ингибирование роста MCF-7 клеток β -GA осуществляется по пути апоптоза [Sharma G. et al., 2012]. При этом S. Schwarz и соавторы установили, что цитотоксическое действие β -GA избирательно лишь в отношении опухолевых клеток MCF-7 [Schwarz S. et al., 2010]. Селективная цитотоксичность β -GA токсичностью по отношению к опухолевым клеткам была подтверждена и в работах других авторов [Yamaguchi H. et al., 2011].

Эффективность химиотерапевтического лечения с применением β -GA и ее производных повышается даже при форме рака с наличием мультилекарственной резистентности. В этом аспекте, особого внимания заслуживает эффективность β -GA в терапии гепатоцеллюлярной карциномы, являющейся одной из самых злокачественных опухолей, которая резистентна к химиотерапии и радиационной терапии. β -GA подавляет апоптоз Т-

клеток и повышает способность Т-клеток атаковать опухолевые клетки, тем самым понижая степень инвазии клеток карциномы [Hibasami H. et al., 2006; Jin L. et al., 2018].

➤ **Гепатопротективное действие β -ГА**

Гепатопротективное действие β -ГА явилось основой ее успешного применения для лечения печеночных патологий [Asl M.N. et al., 2008]: печеночного фиброза и других хронических заболеваний печени [Wu X. et al., 2008]. Литературные данные свидетельствуют о том, что β -ГА ингибирует LPS/D-галактозамин-индуцированное повреждение печени и предотвращает ее токсическое поражение жирными кислотами [Yoshida T. et al., 2007; Wu X. et al., 2008].

В пользу гепатопротективных свойств β -ГА говорят факты, подтверждающие защитное действие при ее предварительном введении в модели повреждения печени, индуцированной тетрахлорметаном (CCl_4) и ретрорсином [Lin G. et al., 1999; Jeong H.G. et al., 2002].

Более того, благодаря антиоксидантным свойствам β -ГА, в модели холестатического поражения печени желчными кислотами, было показано, что она является ингибитором апоптоза и некроза гепатоцитов у крыс [Gumpricht E. et al., 2005]. Исследователями было предложено использование β -ГА для лечения гепатита В, принимая во внимание недостаточную эффективность применяемых для лечения этого заболевания средств. Согласно данным их исследований β -ГА и, особенно, ее производные проявляют высокоую эффективность при лечении гепатита В [Wang L.J. et al., 2012].

Установлено, что β -ГА *in vivo* обладает способностью уменьшать острое повреждение печени, индуцированное лекарствами, вследствие подавления воспалительного протеина-1а макрофагов [Xiao Y. et al., 2010]. Кроме того, исследователями было установлено, наличие у β -ГА протективного действия при *Propionibacterium acnes*-индуцированном остром воспалительном повреждении печени [Xiao Y. 2010].

Выявлено, что β -ГА обладает способностью предотвращать FFA-индуцированное накопление липидов и последующий апоптоз клеток печени у крыс и людей. β -ГА

значительно понижает FFA/HFD-индуцированную печеночную липотоксичность, сохраняя целостность лизосом и митохондрий и подавляя экспрессию и энзиматическую активность катепсина В [Satomi Y. et al., 2005; Wu X. et al., 2008].

➤ **Антиноцицептивное действие производных β -ГА**

Рядом авторов производные β -ГА рассматриваются как потенциальный источник, а возможно и новый класс анальгетиков. Результаты исследований подтвердили наличие у производных β -ГА антиноцицептивного действия при гипералгезии, опосредованного антагонизмом к различным типам ТК рецепторов [Akasaka Y. et al., 2011].

➤ **Нейропротекторные свойства β -ГА**

В последние годы накопились данные о наличии у β -ГА нейропротекторного эффекта, реализующегося стимулированием внутриклеточного сигнального пути (PI3K/Akt) [Као Т.С. et al., 2009]. β -ГА при ишемическом повреждении на модели гипоксического повреждения клеток нейрональной линии PC12 оказывает протективное действие, посредством модуляции внутриклеточной антиоксидантной системы и митохондриально-индуцированного апоптоза.

Все это авторами рассматривается как предпосылка использования β -ГА для лечения неврологических заболеваний [Као Т.С. et al., 2009].

➤ **Антиоксидантная активность β -ГА**

β -ГА уменьшает внутриклеточное содержание реактивных форм кислорода, повышает жизнеспособность клеток, без выраженных побочных эффектов. Ablise M. и соавт. предполагают, что антиоксидантная активность β -ГА и ее производных осуществляется за счет активации супероксиддисмутазы СОД [Ablise M. et al., 2004] и повышения экспрессии других антиоксидантных ферментов [Као Т.С. et al., 2009].

➤ **Фармакокинетика β -ГА**

Установлено, что основным микросомальным ферментом печени человека, ответственным за метаболизм β -ГА является - CYP3A4 [Zhao K. et al., 2012], последний характеризуется высокой субстратной избирательностью. В связи с этим применение β -ГА

вместе с другими лекарственными препаратами, метаболизирующимся тем же ферментом, может вызвать развитие различных непредсказуемых эффектов [Zhao K. et al., 2012]. Кроме того, β -GA понижает активность цитохрома P450 (3A)-CYP3A в эксперименте в условиях *in vitro* и *in vivo*, даже при пероральном применении [Tsukamoto S. et al., 2005], изменяя метаболизм многих лекарств, которые подвергаются биотрансформации под действием CYP3A, с возможным риском особенно для пациентов, применяющих одновременно β -GA с кортикостероидами, дигоксином, варфарином и др. [Li H.Y. et al., 2010].

β -GA проявляет ингибирующий эффект по отношению к различным изоформам UGTs (уридиндифосфат-глюкуронозилтрансфераза) [Huang Y.P. et al., 2013], что может привести не только к развитию лекарственного взаимодействия, но и явиться причиной метаболических нарушений эндогенных соединений (например, конъюгация с билирубином). β -GA полностью подвергается второй фазе элиминации, включая конъюгацию с глюкуроновой кислотой и сульфатирование [Jing J. et al., 2008]. Согласно данным Krahenbuhl S. и др, в зависимости от примененной дозы у людей β -GA имеет $T_{1/2}$ приблизительно 3,5 часа [Krahenbuhl S. et al., 1994].

В связи с низким объемом распределения, с целью повышения эффективности β -GA большой интерес представляют исследования по изысканию новых лекарственных форм, повышающих ее доставку в органы и ткани. Таковой является, напр., липосомальный гель (0,3-0,9% β -GA) который согласно данным экспериментов выражено повышает фармакологическую активность β -GA [Li S. et al., 2012].

ГЛАВА II

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Решение задач, выдвинутых для достижения цели работы, было осуществлено применением комплекса экспериментальных методов, включающих оценку противовоспалительной активности на модели острого ксилолового воспаления уха, определение антиноцицептивной активности в тесте «Tail-flick», исследование ранозаживляющего действия мази в процессе регенерации ожоговых ран, исследование морфологических сдвигов в пульпе зубов на модели экспериментальной гиперестезии дентина и микроскопическое исследование патологических состояний слизистой оболочки полости рта и пародонта.

2.1. Методика оценки противовоспалительной активности на модели острого воспаления

Противовоспалительная активность β -GA (β -глицирретиновая кислота) оценивалась на модели острого воспаления уха крыс, индуцированного ксилолом, как по изменению массы воспаленного уха, так и гистологической оценкой очага воспаления [Ma Y. et al., 2013].

Исследование проводилось на белых беспородных крысах. В первой серии опытов животные были разделены на IV группы по 8 крыс в каждой. Контрольную группу составили крысы, у которых индуцировалось воспаление без введения препарата. Остальным трем группам животных внутрибрюшинно вводились растворы ASA (ацетилсалициловая кислота), диклофенака натрия и β -GA по 10 мг/кг соответственно. Через 30 мин после введения соответствующего препарата крысы усыплялись внутрибрюшинным введением 4%-го раствора хлоралгидрата (400 мг/кг), после чего проводилась аппликация 0,03 мл ксилола с внутренней и внешней сторон правого уха [Foong Ch.P. and Hamid R.A., 2012]. Левое ухо использовалось в качестве контроля-сравнения. Через 1 час животные забивались, затем отделялись участки обеих ушей диаметром 10 мм и взвешивались (рис. 2.1.). По разнице массы левого и правого уха проводилась оценка противовоспалительной активности препаратов [Hosseinzadeh H. et al., 2011; Igbe I. and Inarumen G.O., 2013]. После взвешивания выделенные участки тканей помещались в 10%-ый раствор формалина для последующей морфологической оценки очага воспаления.

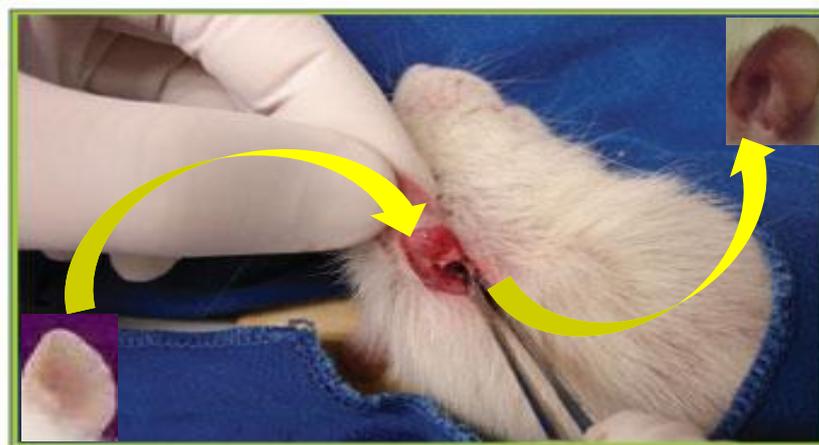


Рис. 2.1. Модель острого воспаления уха крысы, индуцированного ксилолом

Для установления дозозависимости противовоспалительного эффекта β -GA в последующих двух сериях экспериментов были изучены более высокие дозы препарата - 25 мг/кг и 100мг/кг. При этом, аналогично предыдущей серии экспериментов, животные были разделены на группы по 8 крыс в каждой группе.

Для гистологической оценки очага воспаления отделенные участки ушей крыс фиксировали в 10%-ом растворе формалина в течение 6-24 часа, после чего обезвоживали вначале 70%-ым, а затем 80%-ым и 96%-ым этиловым спиртом в течение 24 часов в каждом из указанных растворов спирта, далее выдерживали в ксилоле в течение 30 минут для удаления спирта. Обработанные ткани подвергались парафинизации в термостате при 37°C в течение 3 часов. Из специально оформленных блоков получали срезы тканей при помощи санного микротомы. Парафиновые микротомные срезы толщиной 5 мкм окрашивались гематоксилином-эозином по методу Ван-Гизона [Меркулов Г. А., 1969] (рис. 2.2.).

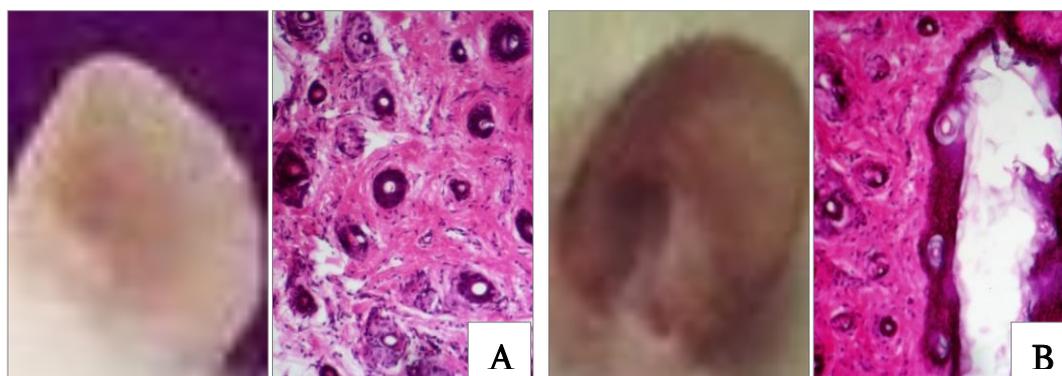


Рис. 2.2. Гистологическая картина уха крысы в норме (А) и при остром воспалении (Б)

Окраска - гематоксилин-эозином.

Увеличение - ок. 10 × об. 12,5 (А, В).

Для окрашивания гематоксилином полученные срезы дважды депарафинизировали ксилолом в течение 1-2 мин, после чего дважды промывали 96%-ым этиловым спиртом в течение 1-2 мин, затем дистиллированной водой в течение 20 мин. Окрашивание гематоксилином проводили в течение 1 часа, после чего срезы оставляли в воде до их окрашивания в синий цвет (гематоксилин окрашивает ядра). Далее в течение 1,5-2 мин окрашивали эозином и оставляли в 96%-ом спирте в течение 1-2 минут. По истечению 5-10 мин готовые срезы тканей переводили в раствор чистого ксилола и накрывали полистиролом [Семченко В.В. и соавт., 2006].

Гистоморфологические исследования были проведены с помощью микроскопа "Jeneval". Используются объективы GF Plan 25 x /0.50 – 0.17A/, GF – Plan 40x (0.65 ~ 0.17A), ок. GF - PW 10x, в состав которого был встроен цифровой фотоаппарат CANON 400D, соединенный с микроскопом и компьютером системой адаптеров той же фирмы.

2.2. Методика определения антиноцицептивной активности в тесте «Tail-flick»

Антиноцицептивная активность β -GA была изучена в тесте «Tail-flick» на Analgesy-meter LE 7106 (Panlab) согласно методу D'Amour, Smith [D'Amour F.E. and Smith D.L., 1941] по латентному времени отдергивания хвоста. Оценка антиноцицептивной активности проводилась также по расчету процента от максимально возможного эффекта (%MPE) с использованием метода расчета по Keil and Delander [Keil G.J. and Delander G.E., 1995].

Уровень ноцицепции тестировался на белых беспородных крысах фокусированием луча света на дорсальную поверхность хвоста с последующей регистрацией порога чувствительности. Интенсивность света регулировалась с таким учетом, чтобы время воздействия не превышало 10-15 секунд, во избежание ожогового повреждения тканей животного [Mandegary A. et al., 2004]. Реакция отдергивания хвоста у интактных крыс в норме возникает в течение примерно 3-5 секунд.

За день до начала эксперимента животные подвергались пищевой депривации и с целью акклиматизации за час до начала опыта переводились из лабораторного вивария в лабораторию. Для оценки антиноцицептивного действия препаратов животных помещали в стеклянную трубку, поддерживая хвост в углублении большим пальцем, не надавливая на него. После чего, включали световую лампу и фиксировали время отдергивания хвоста

предварительно и через 30, 60, 90 и 120 мин после внутрибрюшинного введения соответствующего препарата [Taherian A.A. et al., 2009; Bhavesh K. Lalan et al., 2015] (рис. 2.3).



**Рис. 2.3. Прибор “Tail-flick”
для определения антиноцицептивной активности**

В первой серии экспериментов животные были разделены на IV группы по 8 крыс в каждой. У всех IV групп животных проводилась предварительная оценка болевой чувствительности (Т-исходное или T_0). I-ая группа животных, которым вводили изотонический раствор натрия хлорида, служила контролем. Животным II, III и IV-ой групп после предварительной оценки болевой чувствительности вводились внутрибрюшинно растворы ASA, парацетамола и β -GA в дозах 10 мг/кг, 300мг/кг и 10мг/кг соответственно.

Во второй серии экспериментов, включающей две группы животных по 8 крыс в каждой, была осуществлена оценка болевой чувствительности при иных дозах исследуемых препаратов. С указанной целью животным первой группы внутрибрюшинно вводился раствор ASA в дозе 100мг/кг, а животным второй группы – раствор β -GA в той же дозе. У обеих групп животных фиксировали время отдергивания хвоста предварительно и через 30, 60, 90 и 120 мин после введения соответствующего препарата.

В обеих сериях экспериментов параллельно проводилась оценка антиноцицептивной активности также по расчету процента от максимально возможного эффекта (%MPE) по следующей формуле [Bhavesh K. Lalan et al., 2015]:

$$\text{MPE (\%)} = \frac{\text{Латентное время отдергивания хвоста (T}_{30}, \text{T}_{60}, \text{T}_{90}, \text{T}_{120}) - \text{Исходное время отдергивания хвоста (T}_0)}{\text{Максимальное время разового воздействия (10 сек)} - \text{Исходное время отдергивания хвоста (T}_0)} \times 100\%$$

2.3. Методика исследования ранозаживляющей активности на модели ожоговых ран

Исследование ранозаживляющей активности мази, содержащей β -GA, было осуществлено на белых беспородных крысах. Крысы были разделены на две группы: контрольную и экспериментальную, по 8 крыс в каждой группе.

Исследуемая мазь готовилась по следующей технологии: порошок β -GA (5,0 г), заранее растворенный в нескольких каплях DMSO, по частям добавлялся к водно-эмульсионной основе типа SS-4 (примерно 45,0 г), в условиях постоянного перемешивания до получения однородной массы (50,0 г). Полученная 10%-ая мазь хранилась при температуре 4-5°C.

С целью моделирования термического ожога был использован электропаяльник с насаженной на него прямоугольной латунной пластиной с поверхностью 12 см² (3x4 см), при помощи которой был получен контактный ожог кожи у крыс. Пластина прикладывалась в области спины к депилированной коже крыс обеих групп под эфирным наркозом. Степень нанесения термического ожога контролировалась игольчатым термодатчиком, введенным в подкожную клетчатку непосредственно под местом приложения разогретой пластины. Показатели термодатчика регистрировали на шкале электротермометра. В то время как при прикладывании разогретой пластины к депилированной коже крысы, температура подкожной клетчатки достигала 56-58 С°, нанесенный термический ожог соответствовал ожогу ПВ-ША степени. Полученная ожоговая поверхность обычно составляла около 5% от поверхности тела крыс.

Со второго дня после получения ожога, поверхность ожоговой раны обрабатывалась 2 раза в день: в контрольной группе – мазевой основой типа SS-4, а в экспериментальной группе – заранее приготовленной мазью, содержащей β -GA (примерно по 0,2 г на поверхность).

Определение ранозаживляющей активности мази проводилось оценкой изменения площади раневой поверхности участков наблюдения на 2-е, 7-е, 11-е и 14-е сутки эксперимента в контрольной и экспериментальной группах животных методом планиметрии [Mayrovitz H.N. and Soontupe L.B., 2009] (рис. 2.4.) по модифицированной технике Garros I.C. [Garros I.C. et al., 2006], с применением компьютерной графической программы IMAGE J [Shetty R. et al., 2012].



Рис. 2.4. Планиметрический метод оценки изменения площади раневой поверхности

Для осуществления бактериологического исследования раневого отделяемого на 3-ьи, 7-е и 14-е сутки опыта стерильным ватным тампоном брали мазок с поверхности раны, после чего тампон помещали в стерильную маркированную пробирку и отправляли в бактериологическую лабораторию. Для выявления наличия микроорганизмов проводились посевы: для кишечной группы - на питательную среду «агар-Эндо», для золотистого стафилококка – на желточно-солевой агар, а для грибков - на среду «Сабуро» [Поздеев О.К. и соавт., 2010].

На 3-ьи, 7-е и 14-е сутки эксперимента определяли pH раневой (ожоговой) поверхности при помощи pH-метра мультитест ИПЛ-112 (Semico) (рис. 2.5.).



Рис. 2.5. pH-метр мультитест ИПЛ-112 (Semico)

Для определения соотношения клеток раневого содержимого на 3-ьи, 7-е, 11-е и 14-е сутки эксперимента готовили мазки, которые после обработки 1-2 каплями этилового спирта, окрашивали по Папаниколау [Gupta S. et al., 2009] и отправляли на цитологическое исследование. Подсчет клеточного состава раневых экссудатов контрольной и экспериментальной групп осуществляли с пересчетом на 100 клеток.

2.4. Методика оценки морфологических сдвигов в пульпе зубов на модели экспериментальной гиперестезии дентина

В эксперименте β -ГА использовалась в виде раствора, для приготовления которого 10мг β -ГА эмульгировали с 1-2 каплями DMSO (диметилсульфоксид) и, добавляя дистиллированную воду, доводили объем до 3 мл. Полученный раствор при помощи специального аппликатора наносили на оголенный дентин, приблизительно в объеме 0,02 мл, что соответствует терапевтической дозе на одно нанесение – 0,06 мг.

Исследование проводилось на белых беспородных крысах. Опытные животные были разделены на IV группы (по 8 крыс в каждой): у животных I группы была воспроизведена модель экспериментальной гиперестезии дентина (рис. 2.6.) путем механической обработки зубов с оголением дентинной поверхности. Животным II и III групп, после механического вмешательства, на открытую поверхность дентина наносились DMSO и β -ГА соответственно. Отдельную группу составляли животные, которым вовсе не проводились манипуляции и их зубы служили образцами для сравнения.

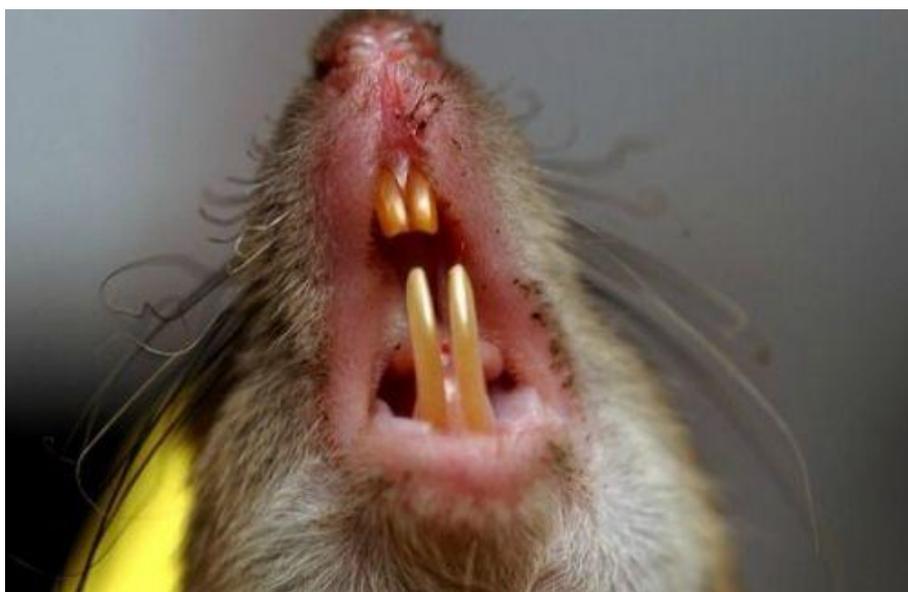


Рис. 2.6. Модель экспериментальной гиперестезии дентина

Ход эксперимента: под нембуталовым наркозом (внутрибрюшинно, 40 мг/кг), в области шейки вестибулярной поверхности нижних резцов, шаровидным алмазным бором создавалось углубление с проникновением в дентин. Производилось протравливание данного участка в течение 1 мин, затем поверхность промывалась и высушивалась, после чего на поверхность наносилось соответствующее вещество в течение четырех дней в одно и тоже время [Брисян Н.А. и соавт., 2012].

Выведение животных из опыта осуществлялось после четырехкратного проведения аппликации вещества с последующим удалением соответствующих зубов во всех группах животных под нембуталовым наркозом. Образцы зубов маркировали и помещали в спиртовой раствор для последующего гистологического исследования. После декальцинации и специальной обработки биопсионного материала, полученные микротомные срезы окрашивали общепринятым методом (гематоксилин-эозином по Ван-Гизону) для оценки морфологической характеристики пульпарной ткани под воздействием исследуемых веществ.

2.5. Метод морфологической оценки клеточного состава слизистой оболочки полости рта и пародонта

Морфологическая оценка слизистой оболочки полости рта и пародонта под влиянием «Ангиноваг»-а, как препарата, содержащего β -ГА, была проведена на 62 больных-добровольцах: 47 больных в основной группе наблюдений и 15 больных в группе сравнения (контрольная группа). Полученные данные регистрировались в динамике наблюдений до и после лечения препаратом, который использовался в виде спрея, строго по инструкции.

Пациенты как основной группы наблюдений, так и группы сравнения были распределены по возрасту и по полу (таб. 2.1.).

Таблица 2.1.
Распределение больных, получавших препарат «Ангиноваг» по возрасту и полу

<i>Возраст</i>	<i>Пол</i>		<i>Группы наблюдений</i>		<i>Общее количество</i>
	М	Ж	Основная	Контрольная	
16-21	6	5	7	4	11
22-30	8	4	10	2	12
31-45	14	4	15	3	18
46-55	10	3	9	4	13
56 и >	6	2	6	2	8
Всего	44	18	47	15	62

Применение препарата согласовывалось с пациентами, учитывая показания и противопоказания (по инструкции), а также клиническое течение нозологической единицы, общее состояние организма (табл. 2.2.).

Таблица 2.2.

**Распределение больных, получавших препарат «Ангиноваг»
по нозологическим группам**

Нозология	Основная группа	Группа сравнения	Общее количество
Герпетический стоматит	8	2	10
Грибковые поражения	7	3	10
Пародонтит (локализованная форма)	5	2	7
Пародонтит (генерализованная форма)	8	2	10
Катаральный стоматит	8	2	10
Гипертрофический стоматит	7	2	9
Гингивостоматит	4	2	6
Всего	47	15	62

Больным основной группы и группы сравнения при заболеваниях пародонта проводились рентгенологические исследования (внутриротовые прицельные снимки, ортопантомография, по необходимости - компьютерная томография), микробиологический анализ по методике Зиновьевой-Каграмановой, где идентифицировались количественные и качественные характеристики обнаруженных бактерий, грибковых поражений, чувствительность к антибиотикам в динамике лечения, до и после получения препарата (содержимое зубодесневых карманов топографических зон ротовой полости, смыв).

При выявленной патологии пародонта, была проведена соответствующая общепринятая терапия, удаление над- и поддесневых отложений, кюретаж. Больным с вирусными (под наблюдением находились только больные с Herpes simplex) и грибковыми поражениями (Candida albicans) препарат назначался в комплексной терапии, учитывая стадийность этапов течения основной патологии, в сочетании с противовирусными и противогрибковыми средствами.

Содержимое смыва СОПР изучали по методике П. М. Покровского и М. С. Макаровой (1962). Пародонтальные карманы предварительно промывали изотоническим раствором хлорида натрия. Забор материала производили корневой иглой и переносили его на

предметное стекло. После фиксации препарата этиловым спиртом производили окрашивание по Граму и Гимзе-Романовскому.

* * *

Лабораторные экспериментальные исследования проведены на 170 белых половозрелых беспородных крысах массой 180-250г. С целью адаптации за 7 дней до начала эксперимента животные содержались в условиях стандартного лабораторного вивария (не более 6 животных в одной клетке) при свободном (ad libitum) доступе к воде и пище (Teklad rat chow) в соответствии с общепринятыми этическими нормами, при комнатной температуре $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, влажности 40%-70%, постоянной вентиляции и стандартном цикле освещения. Уход за животными и лабораторные манипуляции осуществлялись согласно требованиям руководства «The PHS Guide for the Care and Use of laboratory Animals» (1996г). Все эксперименты на животных были осуществлены в интервале времени от 10⁰⁰-14⁰⁰ часов, а за 24 часа до начала эксперимента животные подвергались пищевой депривации. Во всех экспериментах контрольную группу представляли животные, получавшие изотонический раствор хлорида натрия.

Клинические исследования были осуществлены с использованием смыва ротовой полости 62 добровольцев в возрасте старше 16-и лет в соответствии с требованиями этического комитета ЕрГМУ.

В экспериментах были использованы следующие вещества высокой степени очистки:

- β -GA (Chemsavers), 99%-ая;
- дистиллированная вода;
- 4%-ый раствор хлоралгидрата;
- изотонический (0,9%) раствор NaCl (Liqvor);
- ксилол (Реахим);
- 10%-ый раствор формалина;
- стандартная проба порошка ацетилсалициловой кислоты (“Арпи-мед”, Армения);
- диклофенак натрия (“Неморфарм”, Сербия), в ампулах по 3 мл (75мг);
- стандартная проба порошка парацетамола (“Арпи-мед”, Армения);

- 30%-ая водно-эмульсионная основа типа SS-4 производства AL-Fayaseel Laboratories (Amman-Jordan);
- 1%-ый DMSO (ОАО «Марбиофарм», Россия);
- препарат «Ангиноваг» (Ferrer Pharma, Испания) в виде аэрозоля.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием адекватных статистических методов при помощи компьютерных программ IBM SPSS Statistic 20 и Microsoft Excel 2010. Полученные данные экспериментов представлены в виде групповых средних значений \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$) или групповых средних значений \pm стандартная ошибка ($M \pm SE$).

Соответствующие тесты параметрической статистики были применены с предшествующей проверкой нормальности распределения в ряде данных по критерию Колмогорова-Смирнова. Достоверность различий выборок при сравнении результатов двух групп была оценена при помощи двухстороннего t-теста Стьюдента для независимых выборок. Оценка статистической значимости при сравнении двух зависимых выборок была осуществлена при помощи t-критерия Стьюдента для парных выборок. При сравнении результатов данных более чем двух групп при дисперсионной равноценности был применен однофакторный дисперсионный аналитический метод (ANOVA).

Во всех случаях данные считались статистически значимыми при возможном значении ошибки первого типа (α) меньше 0,05.

ГЛАВА III

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование противовоспалительной активности β -глицирретиновой кислоты

Наличие противовоспалительной активности β -GA показано в работах ряда авторов [Chang Y.L. et al., 2010; Chung Y.W. et al., 2011], которые указывают на ее эффективность также и при лечении различных воспалительных заболеваний [Fiore C. et al., 2005; Asl M.N. and Hosseinzadeh H., 2008]. Как указывают полученные ими данные, противовоспалительное действие β -GA реализуется путем ингибирования метаболизма глюкокортикоидов [Kratschmar D.V et al., 2011], подавления классических путей активации комплемента [Kroes B. H. et al., 1997], продукции интерлейкинов, провоспалительных цитокинов и индуцированной продукции простагландина E_2 (PGE_2) [Kang O.H. et al., 2005; Tsukahara M. et al., 2005; Kim S.R. et al., 2012]; активации интерферона у подопытных животных [Abe N. et al., 1982], а также стимулирования экспрессии TLR-4 [Peng L.N et al., 2011]. Немаловажное значение в проявлении указанного эффекта имеет и наличие у β -GA антиоксидантной активности, осуществляемой за счет повышения экспрессии антиоксидантных ферментов [Chen S. et al., 2013; Hussain H. et al., 2018]. Однако анализ литературных данных свидетельствует об отсутствии морфологических подтверждений способности β -GA устранять воспаление, что приобретает особую важность, принимая во внимание наличие препаратов, содержащих β -GA, которая оказывает протекторное действие на поврежденные ткани [Asl M.N. and Hosseinzadeh H., 2008; Kao T.C. et al., 2009; Chen S. et al., 2013].

В связи с вышеуказанным нами была изучена противовоспалительная активность β -GA с морфологическим подтверждением полученных данных. Исследования были проведены на модели индуцированного ксилолом острого воспаления уха крыс с использованием различных доз препарата (10, 25 и 100 мг/кг), с целью выявления возможной дозозависимости эффекта.

Противовоспалительная активность препарата была оценена при сравнении с аналогичными эффектами ASA и диклофенака натрия. Как видно из рис. 3.1. препарат в дозах 10 и 25 мг/кг по своей противовоспалительной активности приближается к действию ASA, а в дозе 100мг/кг – даже превосходит действие ASA, однако уступает диклофенаку натрия.

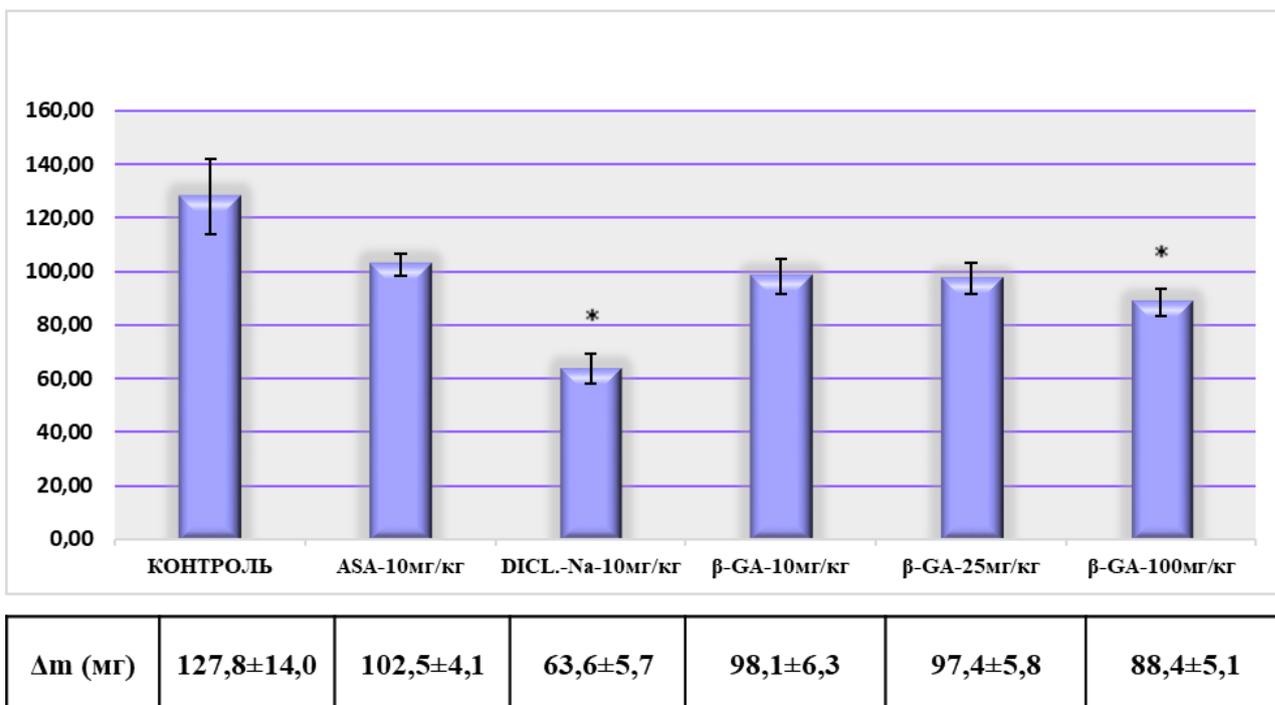


Рис. 3.1. Изменения массы воспаленного ксилолом уха крысы после внутрибрюшинного введения ASA, Dicl.-Na (диклофенак натрия) и β-GA (M±SE, n=8, * p<0,05 по сравнению с ксилоловым воспалением)

Согласно полученным данным, аппликация ксилола в контрольной группе сопровождается увеличением массы правого воспаленного уха более чем в 2 раза по сравнению с невоспаленным ухом, служащим контролем, и составляет 113,7%±7,9% (M±SE). Предварительное внутрибрюшинное введение животным β-GA в дозе 10мг/кг за 30 мин до аппликации ксилола приводит к уменьшению отека тканей, что проявляется предотвращением увеличения массы воспаленного уха на 32,6% по сравнению с ксилоловым воспалением (рис. 3.2). Так, если разность массы воспаленного и интактного уха при ксилоловом воспалении составляла 127,8±14,0 мг, то на фоне введения указанной дозы препарата была 98,1±6,3 мг (рис. 3.1).

Увеличение дозы β-GA до 25 мг/кг с внутрибрюшинным введением последней за 30 мин до аппликации ксилола показало, что масса воспаленного уха меняется приблизительно в той же степени, что и при введении предыдущей дозы, о чем свидетельствует изменение массы воспаленного уха по сравнению с интактным на 97,4±5,8 мг (рис. 3.1).

При введении β-GA в дозе 100мг/кг наблюдается выраженное подавление воспалительного процесса, что приводит к статистически значимому (p<0,05) понижению разности масс

воспаленного и интактного уха животных до $88,4 \pm 5,1$ мг (рис. 16), что свидетельствует том, что исследуемая доза препарата предотвращает индуцированный ксилолом процесс воспаления на 51,0% (рис. 3.2).

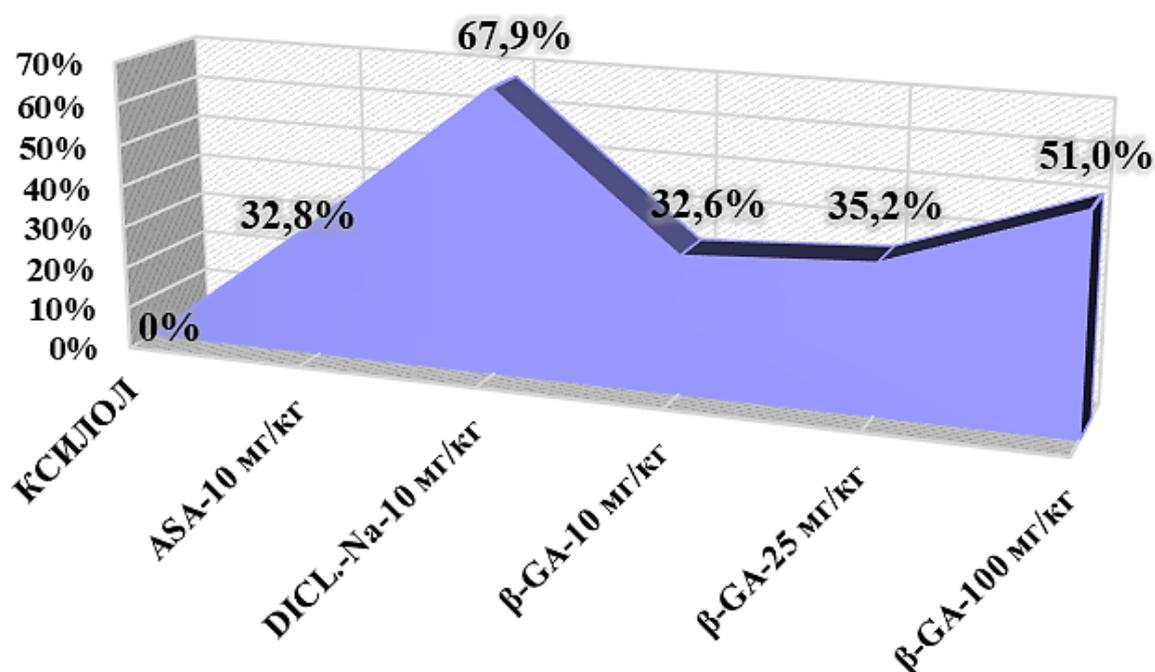


Рис. 3.2. Предотвращение (в процентах) индуцированного ксилолом процесса воспаления уха крысы после внутривентриального введения ASA, Dicl.-Na (диклофенак натрия) и β -GA

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что β -глицирретиновая кислота обладает довольно выраженной противовоспалительной активностью, которая превосходит действие ASA и соизмерима с аналогичным эффектом диклофенака натрия. Подтверждением результатов проведенных в описанной серии экспериментов послужили данные гистологической оценки срезов тканей воспаленного ксилолом уха крысы.

При микроскопировании срезов тканей (толщиной 5-7 мкм), окрашенных гематоксилином-эозином по методу Ван-Гизона [Меркулов Г.А., 1969] было выявлено, что после аппликации ксилола у животных контрольной группы на фоне отека тканей выявляются значительные изменения гистиоструктуры исследуемой ткани. В тканях уха крыс этой группы наблюдаются признаки жировой дистрофии (рис. 3.3.A), деструктивные процессы в хрящевой ткани (рис. 3.3.B) и многочисленные некротические очаги в виде некроза

волосяных фолликулов (рис. 3.3.C), выявляется картина коагуляционного некроза с разрушенными (поврежденными) железами (рис. 3.3.D).

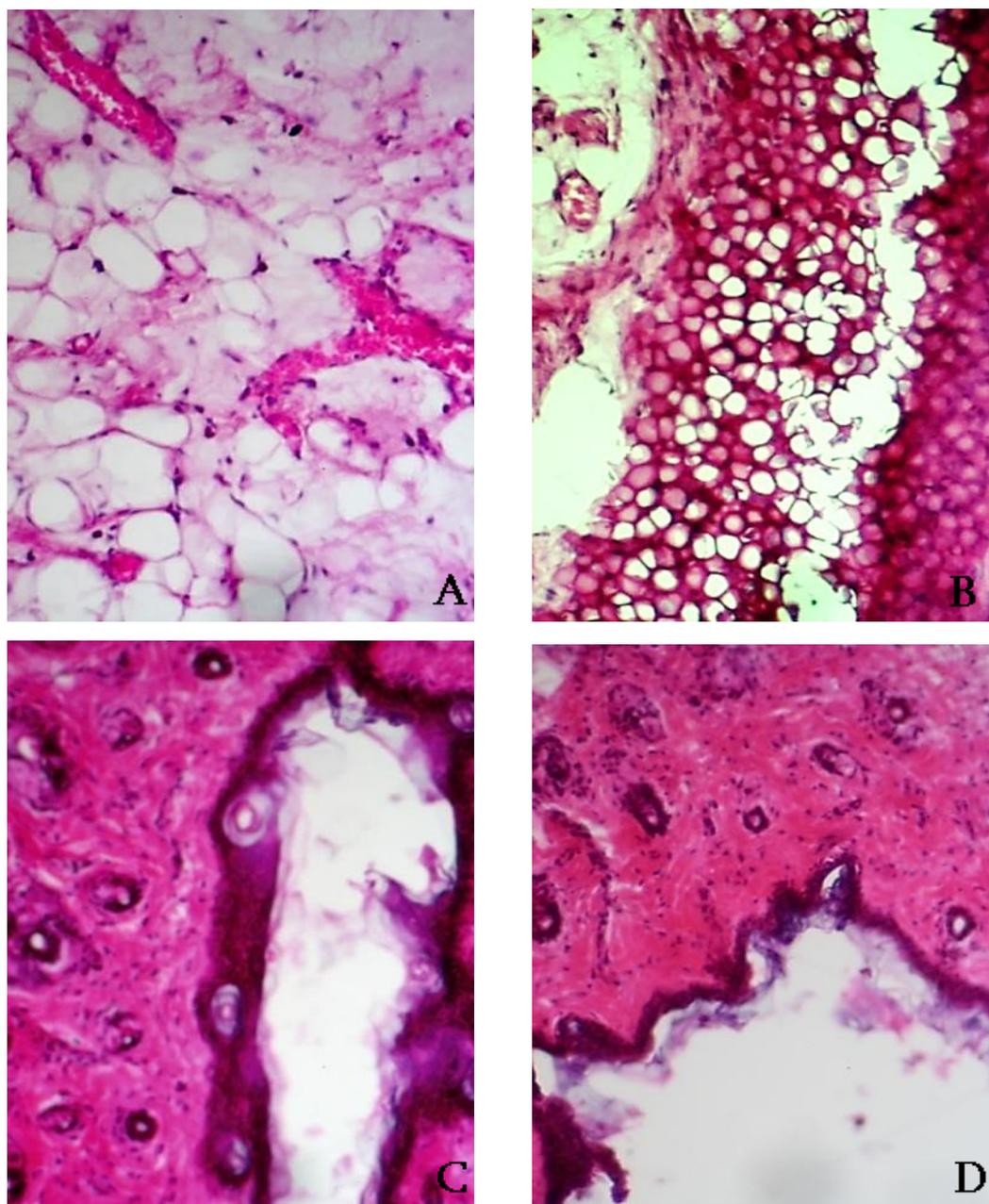


Рис. 3.3. Морфологические изменения в тканях уха крыс контрольной группы после индуцированного ксилолом воспаления:

**А – жировая дистрофия; В – деструктивные процессы в хрящевой ткани;
С – некроз волосяного фолликула; D – коагуляционный некроз дермальной
ткани желез.**

Окраска - гематоксилин-эозином.

Увеличение - ок. 10 × об. 12,5 (A, B, C, D).

Отмеченные выше патологические сдвиги, выражены несколько слабее на фоне предварительного внутрибрюшинного введения ASA в дозе 10 мг/кг за 30 мин до аппликации ксилола (рис. 3.4.).

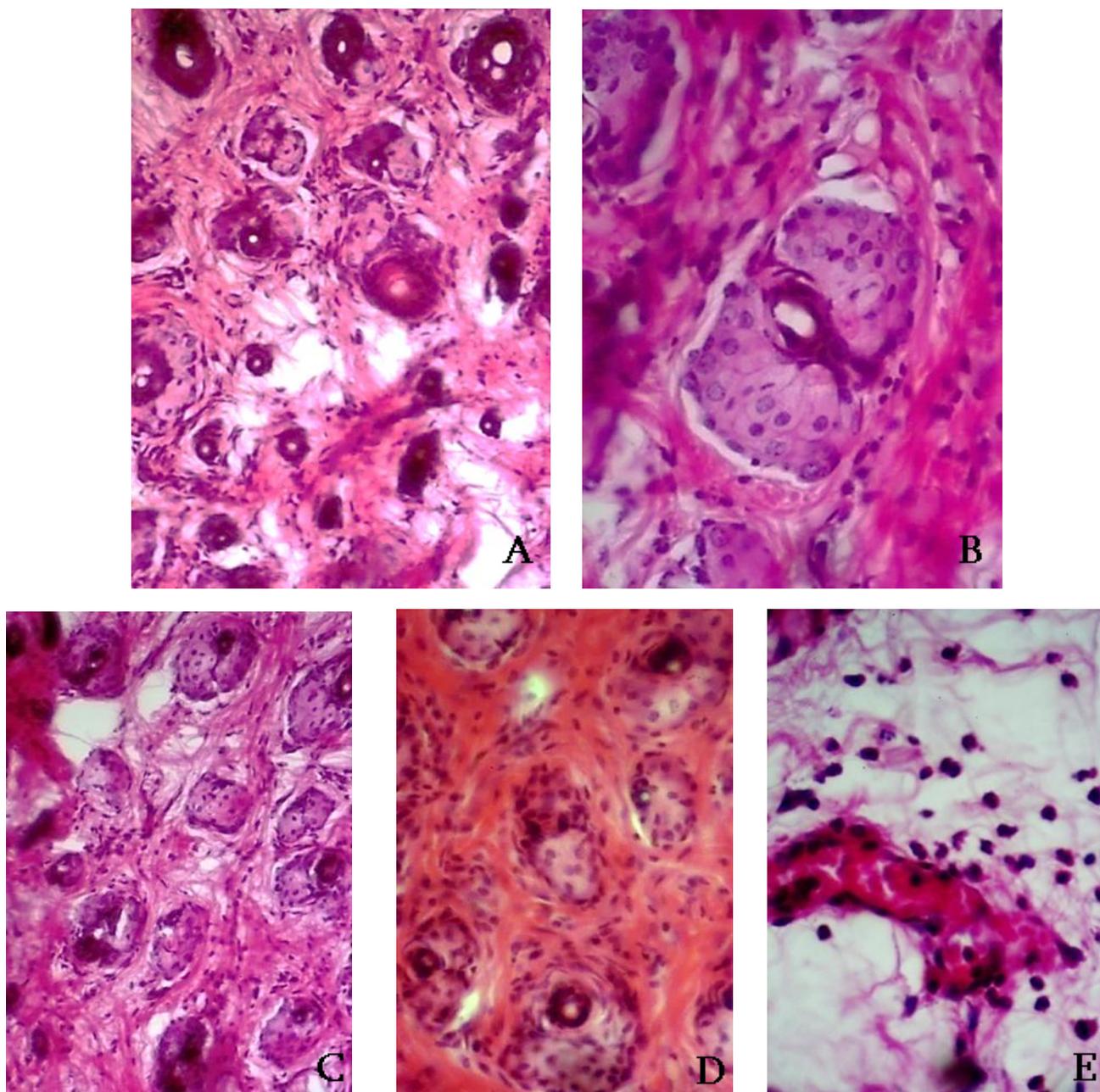


Рис. 3.4. Морфологические изменения в тканях уха крыс, после индуцированного ксилолом воспаления при предварительном внутрибрюшинном введении ASA (в дозе 10 мг/кг):

А – сохраненные волосяные фолликулы; В – оформленный железистый эпителий; С – сохраненные эластичные волокна; D – лимфоидная инфильтрация желез и волосяных фолликулов, E – явления стаза эритроцитов.

Окраска - гематоксилин-эозином.

Увеличение -ок. 10 × об. 25 (А, В, С, D, E).

По сравнению с предыдущей группой, в поверхностных слоях дермы отмечается тенденция к сохранению нормальных гистиоструктурных элементов. Волосные мешочки относительно развиты (рис. 3.4.А), местами наблюдается оформленный железистый эпителий (рис. 3.4.В), с наличием эластичных волокон (рис. 3.4.С).

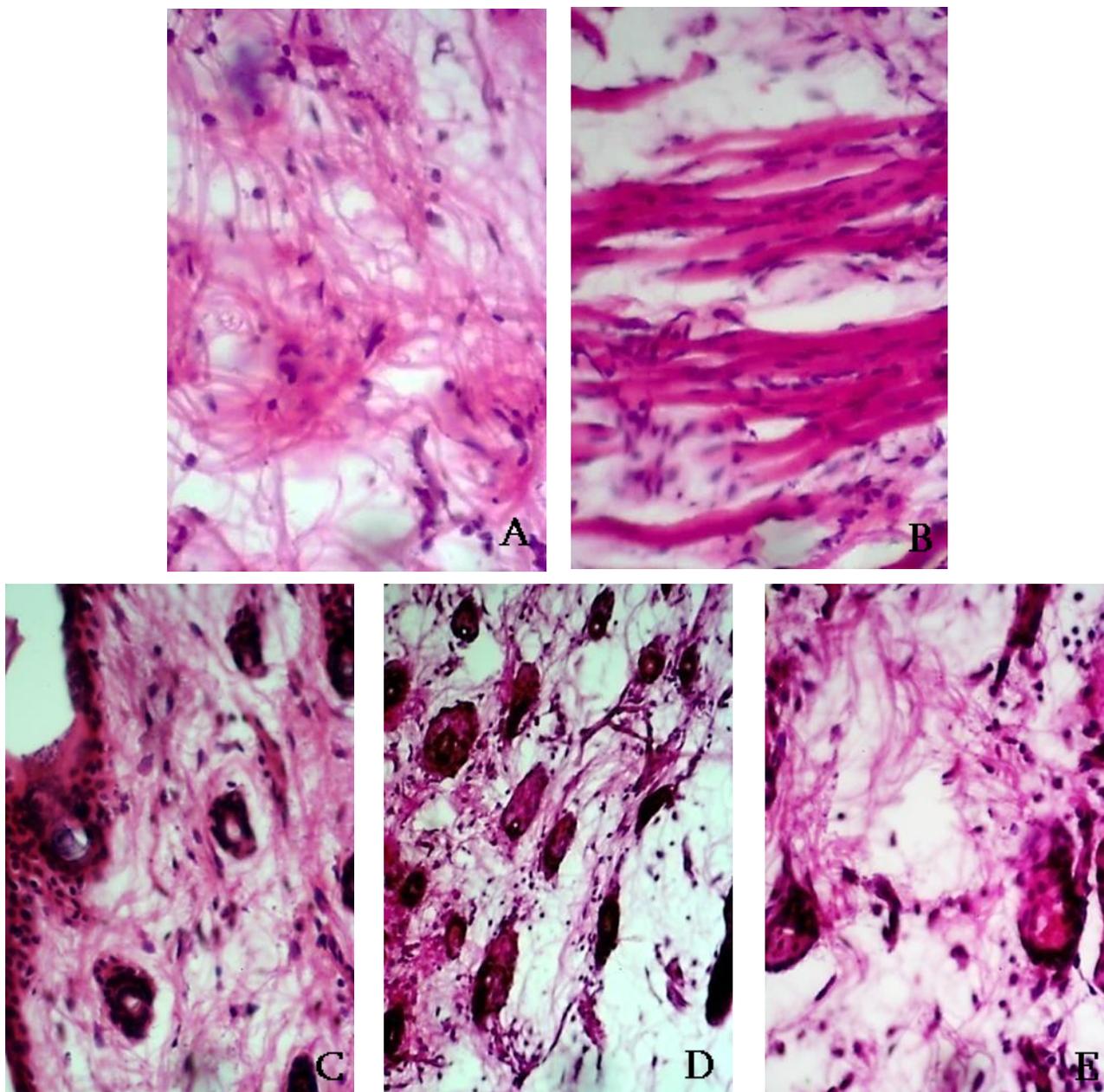


Рис. 3.5. Морфологические изменения в тканях уха крыс после индуцированного ксилолом воспаления при предварительном внутрибрюшинном введении диклофенака натрия (в дозе 10 мг/кг):

А – сохраненные эластичные волокна; В – сохраненные поперечнополосатые мышцы; С – очаги некроза; D – лимфоидная инфильтрация и жировая дистрофия ткани, E – очаги дисконфлексии эластичных волокон.

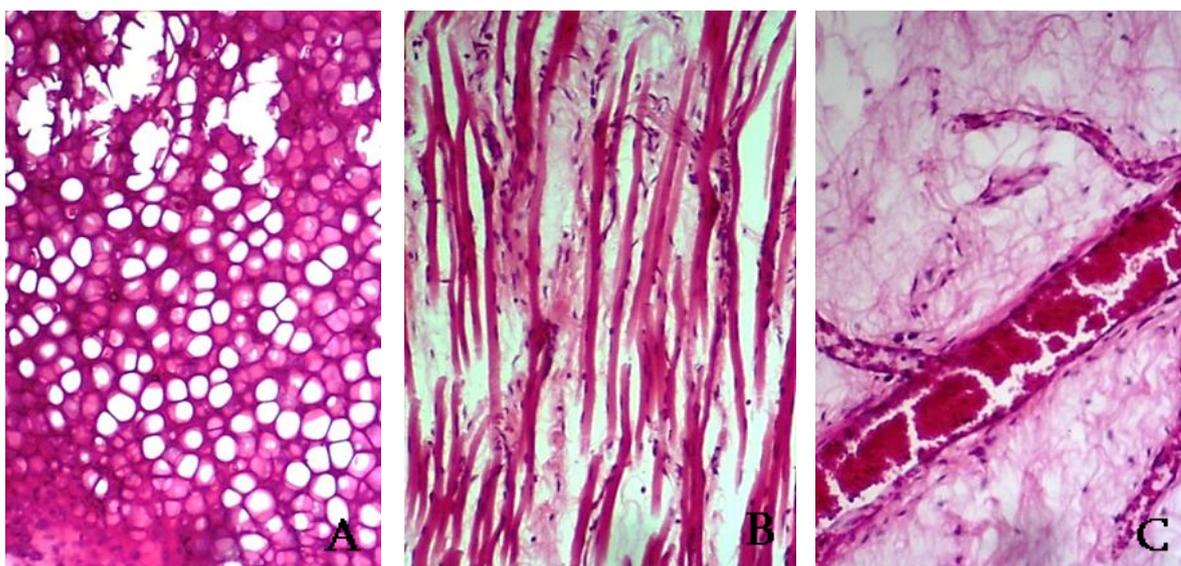
Окраска - гематоксилин-эозином.

Увеличение - ок. 10 × об. 12,5 (А, С, D, E); ок. 10 × об. 25 (В).

Однако, наряду с этим, выявляются некоторые гистоморфологические нарушения в виде очагов лимфоидной инфильтрации вокруг желез и волосяных фолликулов (рис. 3.4.D), а также стаза эритроцитов с наличием макрофагальных элементов (рис. 3.4.E).

На фоне предварительного введения диклофенака натрия в дозе 10 мг/кг за 30 мин до аппликации ксилола наблюдается следующая гистоморфологическая картина. Четко выявляются эластичные волокна (рис. 3.5.A) и поперечнополосатые мышцы (рис. 3.5.B). Частично наблюдается формирование волосяных фолликулов с изредка встречающимися некротизированными элементами (рис. 3.5.C). Однако, видны очаги жировой дистрофии (рис. 3.5.D), с лимфоидной инфильтрацией и дисконкомплексацией эластичных волокон (рис. 3.5.E).

Принимая во внимание превалирование противовоспалительной активности β -GA в дозе 100мг/кг, было проведено гистологическое исследование способности β -глицирретеновой кислоты предотвращать процесс воспаления также и в указанной дозе препарата. По сравнению с морфологической картиной срезов тканей воспаленного уха, полученных в контрольной группе и после применения препарата сравнения - ASA, на фоне предварительного введения β -GA в дозе 100мг/кг за 30 мин до аппликации ксилола, гистоморфологические изменения, обусловленные ксилоловым воспалением, были выражены слабее (рис. 3.6.).



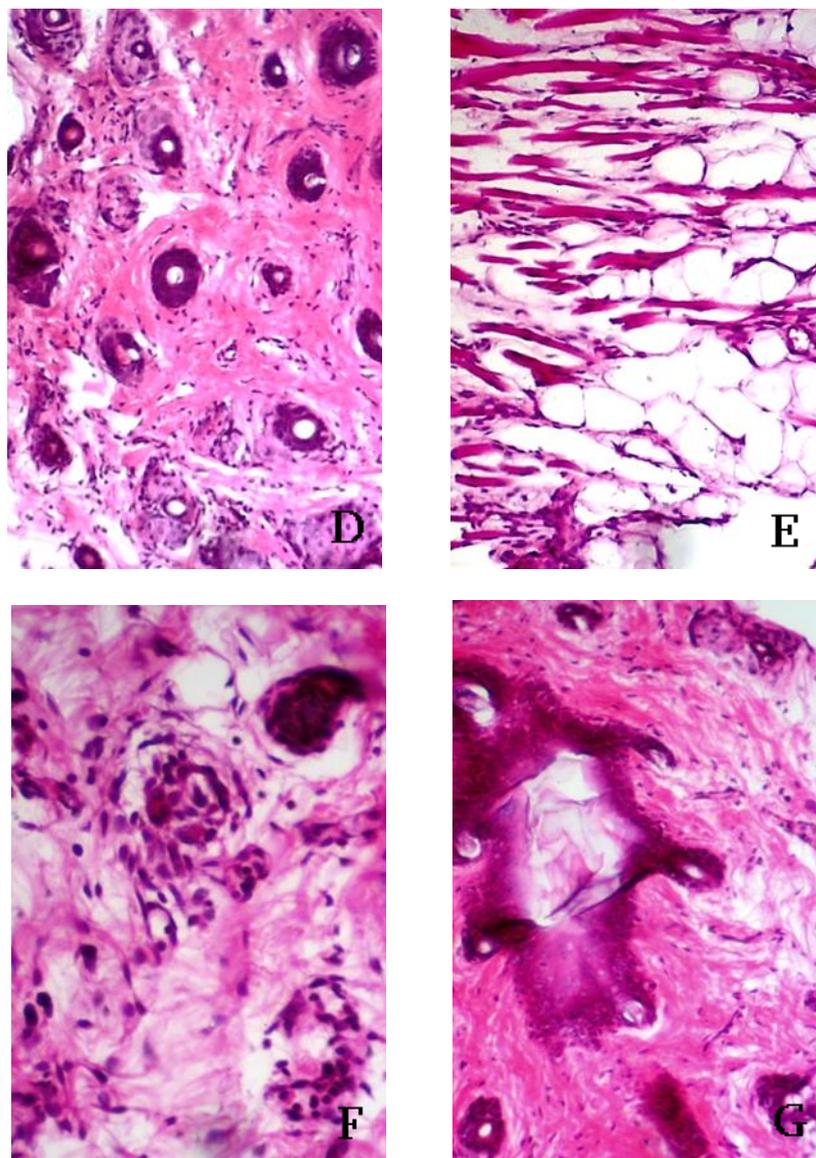


Рис. 3.6. Морфологические изменения в тканях уха крыс после индуцированного ксилолом воспаления при предварительном внутривнутрибрюшинном введении β -GA (в дозе 100мг/кг):

А – сохраненная хрящевая ткань; В – сохраненные поперечнополосатые мышцы; С – формирование сосудов; D – сохраненный волосяной фолликул; E – очаги жировой дистрофии; F –инфильтрации в железах и фолликулах; G – очаги некроза.

Окраска - гематоксилин-эозином.

Увеличение - ок. 10 × об. 12,5 (А, В, С, D, E, F, G).

Так, в этой группе экспериментов хотя и наблюдаются некоторые патологические изменения: очаги жировой дистрофии (рис. 3.6.E), инфильтрации в железах и фолликулах (рис. 3.6.F), а также очаги некроза, окруженные соединительнотканными клетками (рис.

3.6.G), однако четко проявляются положительные сдвиги. Об этом свидетельствует сравнительная сохранность как хрящевой ткани (рис. 3.6.A), так и поперечнополосатой мускулатуры (рис. 3.6.B). Кроме того, четко выявляются сосудистая система (рис. 3.6.C) и волосяные фолликулы (рис. 3.6.D).

Таким образом, данные гистологического исследования полностью подтвердили полученные результаты экспериментов, свидетельствующих о наличии противовоспалительной активности β -глицирретиновой кислоты.

3.2. Исследование антиноцицептивной активности β -глицирретиновой кислоты

Результаты исследований по изучению противовоспалительной активности β -GA с соответствующим морфологическим подтверждением послужили основой для анализа ее антиноцицептивной активности, поскольку для соединений, проявляющих противовоспалительное и анальгетическое действие, указанный показатель является одним из важных критериев, позволяющих оценить природу обезболивающего эффекта последних [Hussain H. et al., 2018]. Антиноцицептивная активность β -GA была исследована в тесте отдергивания хвоста, широко используемого в экспериментальной фармакологии. Рефлекс отдергивания хвоста является спинальным и характерен только для позвоночных животных, хотя при определенных условиях рефлекс подвержен и супраспинальным влияниям [Kiefel J.M. et al., 1993]. Преимуществами теста «Tail-flick» является то, что при его помощи определяется именно наличие центрального обезболивающего компонента у исследуемого соединения. Так, при анализе литературных данных, было выявлено, что в действительности препараты только с периферическим механизмом антиноцицептивного действия практически не меняют латентное время отдергивания хвоста в тесте «Tail-flick» [Park S.H. et al., 2011; Mohammadi S. et al., 2016]. Принимая во внимание вышеизложенное, нами была изучена и оценена антиноцицептивная активность β -GA при сравнении с такими известными анальгетиками, как ASA и парацетамол.

Данные, представленные в табл. 3.1., указывают на то, что антиноцицептивная активность β -GA сравнима с активностью препаратов сравнения.

Таблица 3.1.

**Изменения латентного времени отдергивания хвоста у крыс в тесте «Tail-flick» при
внутрибрюшинном введении ASA, парацетамола, β -GA ($M \pm SD$, $n=8$)**

Время (мин)		0	30	60	90	120
Латентное время отдергивания хвоста, сек	Контроль (NaCl 0,9%)	5,6 \pm 0,15	4,2 \pm 0,17*	3,7 \pm 0,19*	3,0 \pm 0,22*	2,4 \pm 0,20*
	ASA (10мг/кг)	5,3 \pm 0,22	4,8 \pm 0,54*	4,3 \pm 0,50*	3,4 \pm 0,38*	2,8 \pm 0,34*
	ASA (100мг/кг)	5,2 \pm 0,25	5,6 \pm 0,16*	4,5 \pm 0,39*	4,0 \pm 0,30*	3,4 \pm 0,24*
	Парацетамол (300мг/кг)	5,2 \pm 0,23	5,9 \pm 0,54*	6,7 \pm 0,42*	5,8 \pm 0,26*	4,9 \pm 0,35
	β -GA (10мг/кг)	5,3 \pm 0,19	4,8 \pm 0,20*	4,0 \pm 0,28*	3,5 \pm 0,27*	2,7 \pm 0,23*
	β -GA (100мг/кг)	5,6 \pm 0,27	6,1 \pm 0,42*	5,8 \pm 0,38	3,9 \pm 0,62*	2,7 \pm 0,40*

* $p < 0,05$ по сравнению с исходной величиной (T исходное или T_0)

Так, применение β -GA в дозе 10 мг/кг почти не вызывает развития обезболивающего эффекта, о чем свидетельствуют лишь незначимые сдвиги латентного времени отдергивания хвоста во всех временных интервалах регистрации исследуемого показателя в сравнении с контрольными данными (табл. 3.1. и рис. 3.7.).

Как показывают результаты проведенных экспериментов, увеличение дозы β -GA до 100мг/кг сопровождается статистически значимым ($p < 0,05$) изменением латентного времени отдергивания хвоста в исследуемом тесте. Так, если у контрольной группы животных через 30 мин после предварительной оценки порог болевой чувствительности уменьшается на 25,0%, то в группе животных, получивших β -GA в дозе 100мг/кг, увеличивается на 8,9%, что является свидетельством того, что через 30 мин β -GA повышает порог болевой чувствительности в сравнении с контрольной группой на 33,9%. Затем отмечается постепенное ослабление эффекта препарата с восстановлением болевой чувствительности. Об этом свидетельствует уменьшение латентного времени отдергивания хвоста, которое на 60-ой минуте введения препарата оказывается выше того же показателя для T исходного всего на 3,6%. Затем к 90-ой и 120-ой минутам введения эффект препарата снижается, при этом регистрируется уменьшение латентного времени отдергивания хвоста соответственно на 30,4% и 51,8% по сравнению со стартовой величиной. Таким образом, согласно

полученным данным, максимальный антиноцицептивный эффект β -GA проявляется через 30 мин после введения препарата (табл. 3.1.).

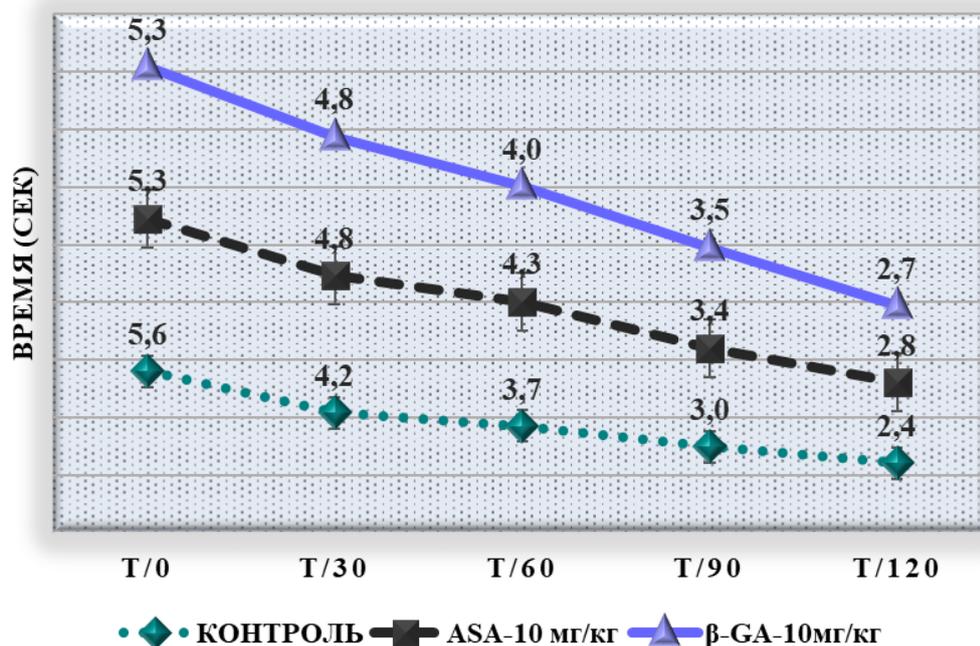


Рис. 3.7. Влияние ASA и β -GA в дозе 10мг/кг на латентное время отдергивания хвоста (сек) крыс в тесте «Tail-flick» ($M \pm SD$, $n=8$)

При сравнении описанного эффекта β -глицирретиновой кислоты с таковыми ASA, оказалось, что в дозе 10 мг/кг ацетилсалициловая кислота, как и β -GA, не вызывает развития значимого эффекта (рис. 3.7.), а в дозе 100мг/кг ослабляет болевую чувствительность на 7,7% к 30-ой минуте введения препарата. Дальнейшая регистрация латентного времени отдергивания хвоста на 60, 90 и 120-й минутах после введения ASA показала, что болевая чувствительность постепенно восстанавливается с уменьшением исследуемого показателя на 13,5%, 23,1% и 34,6% соответственно.

Итак, повышение порога болевой чувствительности через 30 минут после введения β -GA в дозе 100мг/кг практически не отличается от такового после введения ASA, хотя после введения β -GA болевая чувствительность восстанавливается медленнее, чем при применении ASA. Об этом свидетельствует то обстоятельство, что через 60 минут после введения β -GA порог болевой чувствительности все еще остается выше того же показателя для Т исходного. Обращает на себя внимание также и тот факт, что при применении ASA к 60-ой минуте уже наблюдается значительное снижение порога болевой чувствительности по сравнению с Т исходным (рис. 3.8.).

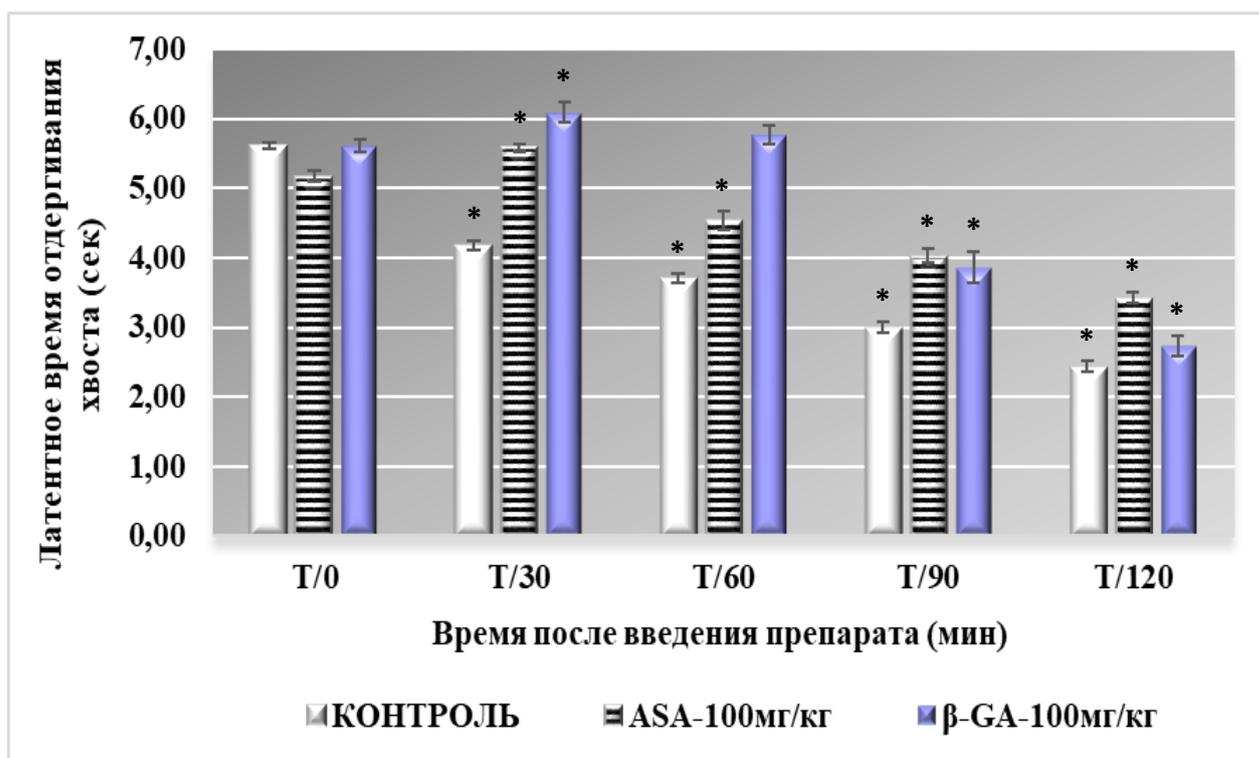


Рис. 3.8. Влияние ASA-а в дозе 100мг/кг и β-GA в дозе 100мг/кг на латентное время отдергивания хвоста (сек) крыс в тесте «*Tail-flick*» ($M \pm SD$, $n=8$, $*p < 0,05$ по сравнению с исходной величиной (T исходное или T_0))

По-существу, хотя ASA и характеризуется преимущественно периферическим механизмом анальгетического действия, однако, как показывают проведенные нами эксперименты, все-таки проявляет некоторую антиноцицептивную активность в тесте «*Tail-flick*». При анализе литературных данных выяснилось, что исследованиями ряда авторов также констатирован факт проявления ацетилсалициловой кислотой антиноцицептивной активности в аналогичных тестах («*hot plate*» test) [Ruggieri V. et al, 2010]. По всей вероятности, антиноцицепция, регистрируемая на фоне применения ASA, скорее является следствием ее противовоспалительного действия, кроме того, возможно, что в развитии обезболивающего эффекта ASA задействовано также активирование центральной серотонинергической системы.

В следующей серии экспериментов был проведен сравнительный анализ антиноцицептивной активности β-GA с препаратом, антиноцицептивная активность которого осуществляется при участии центрального механизма. С указанной целью в качестве

препарата сравнения был выбран парацетамол. Для парацетамола в принятой в литературе дозе, равной 300 мг/кг [Жамгарян А.Г., 2008] в тесте «Tail-flick», описана антиноцицептивная активность, которая проявляется увеличением латентного времени отдергивания хвоста. В проведенных нами экспериментах в результате ослабления болевой чувствительности было зарегистрировано увеличение латентного времени отдергивания хвоста по сравнению с контролем через 30, 60 и 90 мин после введения парацетамола на 13,5%, 28,8%, 11,5% соответственно, а к 120 минуте введения препарата порог болевой чувствительности был снижен лишь на 5,8% (табл. 3.1. и рис. 3.9).

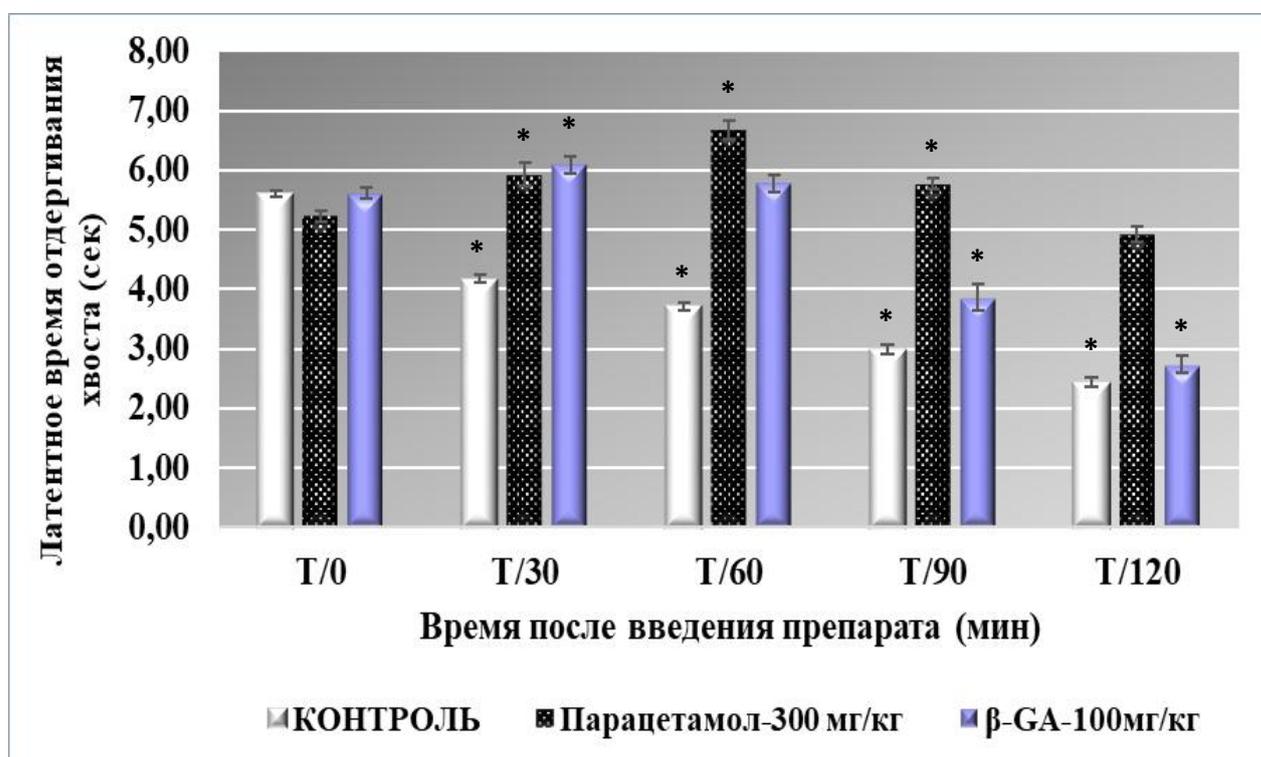


Рис. 3.9. Влияние парацетамола в дозе 300мг/кг и β-GA в дозе 100мг/кг на латентное время отдергивания хвоста (сек) крыс в тесте «Tail-flick» ($M \pm SD$, $n=8$, $*p < 0,05$ по сравнению с исходной величиной (T исходное или T_0))

Результаты данной серии экспериментов относительно антиноцицептивной активности β-GA были подтверждены также и расчетом принятого в литературе показателя ноцицепции – процента от максимально возможного эффекта %MPE [Bhavesh K. Lalan et al., 2015].

%MPE дает возможность оценить выраженность антиноцицептивного эффекта исследуемого соединения: чем выше значение индекса латентности, тем более выражен

указанный показатель. Как видно из рис. 3.10., индекс латентности для временных интервалов 30, 60, 90 и 120 мин внутрибрюшинного введения β -ГА составляет (-) 9,5%, (-) 26,6%, (-) 37,1% и (-) 54,5% соответственно, что свидетельствует о том, что показатели латентности для β -ГА в дозе 10 мг/кг также доказывают отсутствие существенных изменений чувствительности по сравнению с исходным уровнем.

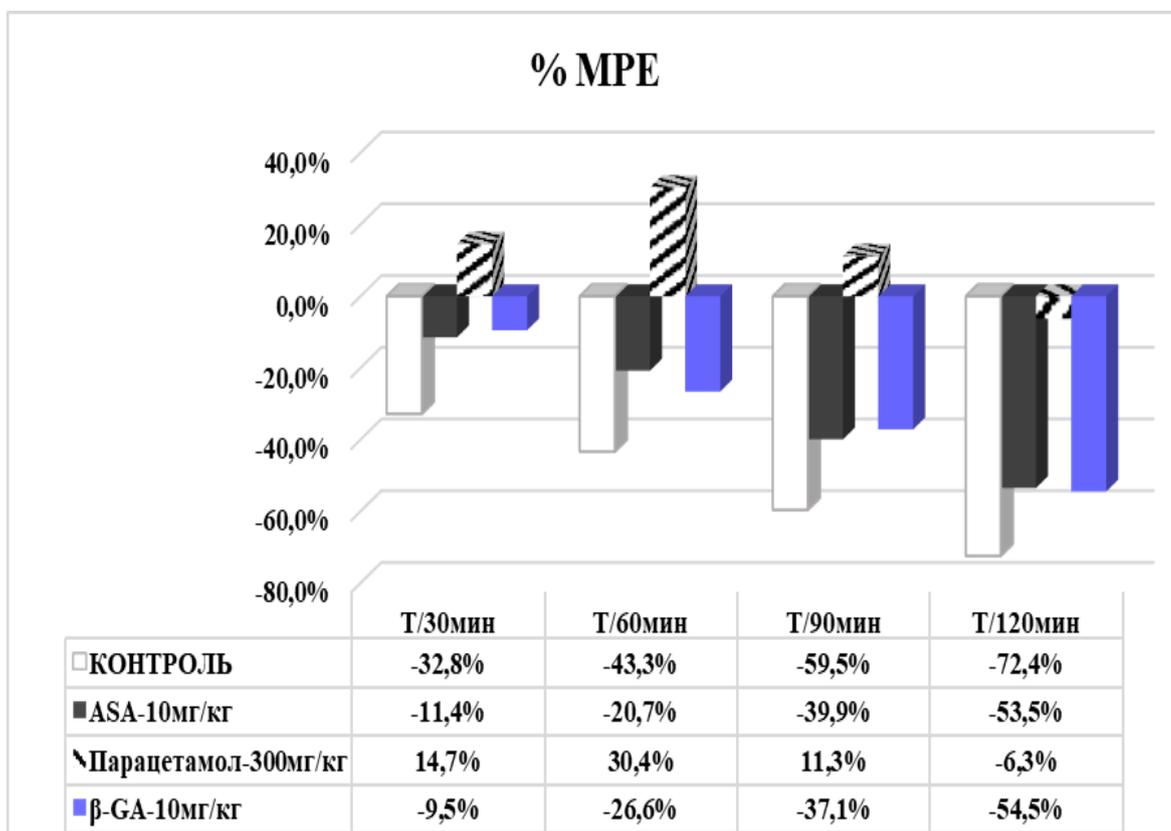


Рис. 3.10. Показатель индекса латентности (%MPE) ASA (10мг/кг), Парацетамола (300мг/кг) и β -ГА (10мг/кг) в тесте «Tail-flick» (n=8)

Другая картина наблюдается при расчете индекса латентности после введения β -ГА в дозе 100 мг/кг. Согласно данным, представленным на рис. 3.11., на 30, 60, 90 и 120 мин после введения β -ГА рассчитанный показатель составляет 10,8%, 3,7%, (-)39,9% и (-)65,5%. При этом, согласно представленным данным максимальная антиноцицептивная активность β -ГА в дозе 100мг/кг регистрируется через 30 минут после введения препарата.

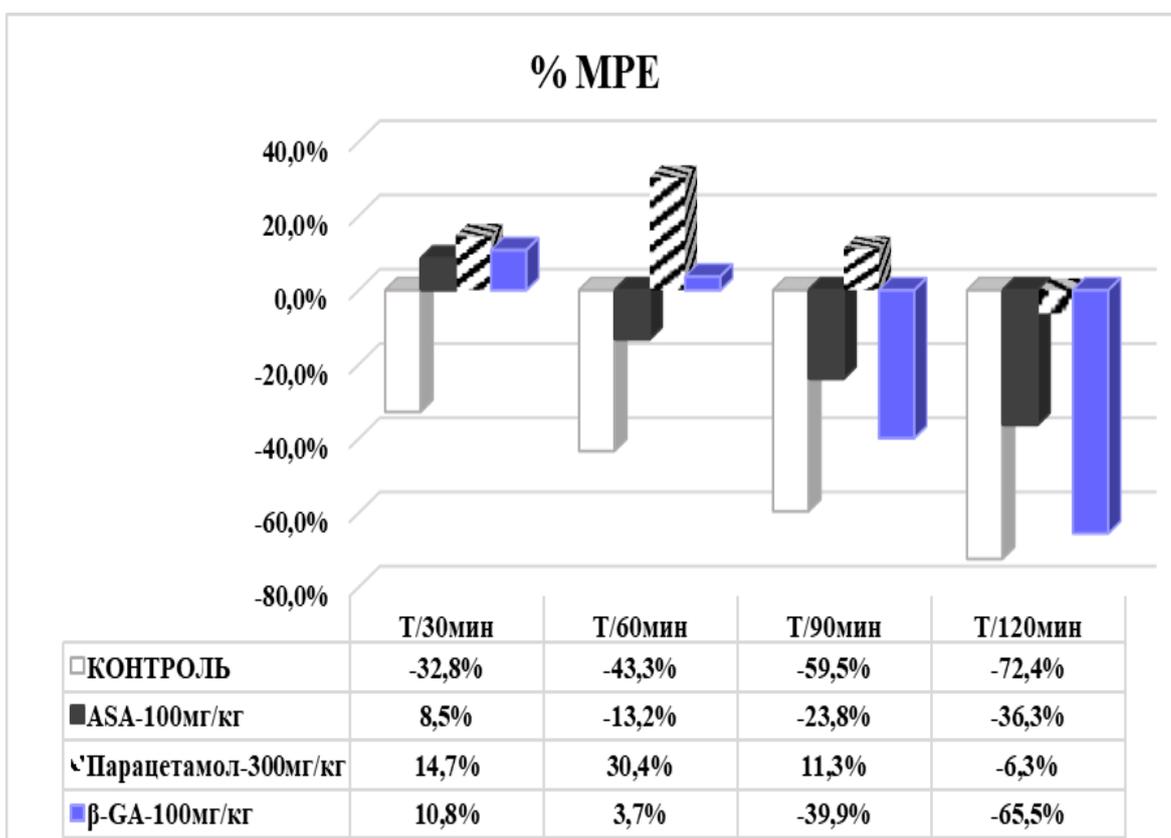


Рис. 3.11. Показатель индекса латентности (%MPE) парацетамола (300мг/кг), ASA (100мг/кг) и β-GA (100мг/кг) в тесте «Tail-flick» (n=8)

Таким образом, обобщая результаты данной серии экспериментов можно заключить, что β-GA обладает антиноцицептивным действием. Анализируя возможные механизмы описанного фармакологического эффекта, можно предположить, что в реализации антиноцицепции, регистрируемой после введения β-GA, задействованы следующие предполагаемые механизмы:

- Во-первых, противовоспалительный эффект, описанный в предыдущей главе, дает основание утверждать о способности β-GA подавлять воспалительный процесс, что в большинстве случаев сопровождается болевым синдромом.
- С другой стороны, согласно литературным данным [Akasaka Y. et al., 2011] производные β-GA проявляют антагонизм к различным типам тахикиноновых или нейрокининовых рецепторов, играющих важную роль в перцепции боли. Эти данные подтверждают также и участие центральных механизмов и проявлении анальгезирующего эффекта β-GA.
- В-третьих, β-GA обладает антиоксидантным действием, что также вносит вклад в антиноцицептивное действие [Chen S. et al., 2013; Asl M.N. and Hosseinzadeh H., 2008].

3.3. Исследование ранозаживляющей способности 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты

Полученные результаты относительно выраженной противовоспалительной и антиноцицептивной активности β -GA в совокупности с накопленными за последние годы многочисленными данными о ее антибактериальном, иммуномодулирующем, антиоксидантном действии, а также регенерирующей способности, послужили основанием для разработки 10%-ой мази β -GA, с последующим исследованием ее ранозаживляющей способности при различных раневых повреждениях, в частности при ожоговых травмах.

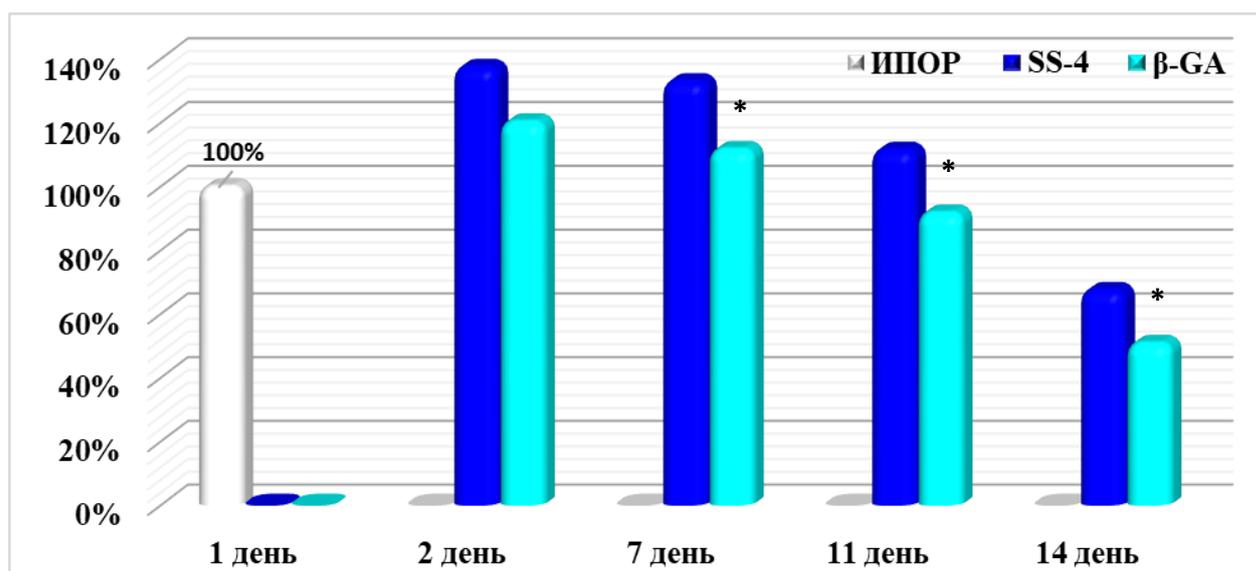
Целесообразность подобного подхода в исследовании возможных проявлений указанной выше фармакологической активности 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты была обусловлена данными литературы о принципиально новом подходе местного лечения ран и ожогов, при применении веществ с антиоксидантным действием, каким является β -GA [Chen S. et al., 2013; Asl M.N. and Hosseinzadeh H., 2008]. Хорошо известно, что термическая травма вызывает выброс цитокинов и простагландинов, в результате чего активируется взаимодействие между лейкоцитами, тромбоцитами и клетками эндотелия. При этом активация лейкоцитов (в первую очередь, полиморфно-ядерных) и тромбоцитов ведет к избыточному накоплению реактивных форм кислорода и азота, что сопровождается повреждением эндотелиоцитов микроциркуляторного русла и нарушением проницаемости капилляров. Проявляется это дисбалансом между активностью радикалопродуцирующей и антиоксидантной систем, в результате чего накапливаются свободные радикалы, что сопровождается резкой интенсификацией процессов перекисного окисления липидов, как в зоне паранекроза, так и в прилегающих тканях. Все эти нарушения являются причиной формирования зон вторичного некроза и увеличения глубины поражения тканей [Latha V. and Babu M. 2001; Parihar A. et al., 2008].

Данные доказательной медицины не оставляют сомнений относительно непосредственной связи реактивных форм кислорода с многочисленными патологическими процессами, включающими воспаление, метаболические нарушения, клеточное старение, перфузионные нарушения, атеросклероз, канцерогенез и т.д [Poprac P. et al., 2017]. Более того, реактивные формы кислорода индуцируют программированную смерть клетки или некроз, подавление и экспрессию многих генов, активируют клеточные сигнальные каскады.

Окислительное повреждение нуклеиновых кислот, приводящее к развитию определенных опухолей и окислительное повреждение липидов, приводящее к различным сосудистым и нейродегенеративным заболеваниям, также ассоциированы с реактивными формами кислорода [Bergamini S.M. et al., 2004]. Все это еще больше повышает ценность веществ с наличием антиоксидантных свойств, таких как β -GA, особенно с учетом того, что последняя оказывает антиоксидантное действие без развития ощутимых побочных эффектов.

Приведенные данные полностью обосновывают возможное применение 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты в условиях термического ожога с оценкой ее ранозаживляющего действия.

Ранозаживляющее действие 10%-ой мази β -GA, было исследовано расчётом изменений площади поверхности ожоговой раны, рН-метрией ожоговой поверхности и оценкой микрофлоры раневого экссудата с морфологическим подтверждением полученных данных.



	ИПОР	2 день	7 день	11 день	14 день
SS-4	100%	137,5%±20,3%	133,0%±14,4%	111,5%±13,9%	67,5%±14,0%
β -GA		120,4%±12,1%	111,7%±13,2%	91,7%±8,8%	50,9%±7,7%

Рис. 3.12. Изменения площади поверхности ожоговой раны (в процентах) в различные сроки эксперимента в контрольной (SS-4) и экспериментальной (β -GA) группах по сравнению с ИПОР (исходная площадь ожоговой раны) ($M \pm SD$, $n=8$, $*p<0,05$ по сравнению с контрольной величиной)

При оценке площади поверхности ожоговой раны методом планиметрии было выявлено, что применение 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты (дважды в сутки по 0,2 г на поверхность), сопровождается довольно быстрым заживлением раневой поверхности по сравнению с аналогичными результатами в группе животных, раны которых обрабатывались только мазевой основой (рис. 3.12.).

Как свидетельствуют результаты проведенных экспериментов, уже на 2-е и 7-е сутки в экспериментальной группе животных отмечались изменения площади ожоговой раны по сравнению с контрольной группой. На 11-е и 14-е сутки было зарегистрировано уменьшение поверхности ожоговой раны по сравнению с контролем. Так, если в контрольной группе уменьшение площади раневой поверхности отмечается лишь на 14-е сутки эксперимента, составляя 67,5% по сравнению с исходной величиной, то в группе животных, раны которых обрабатывались 10%-ой мазью β -глицирретиновой кислоты, значимое сокращение площади ожоговой поверхности по сравнению с исходной площадью ожоговой раны отмечалось уже на 11-е сутки на 8,3% ($p < 0,05$), а на 14-е сутки – на 49,1% (рис. 3.12.).

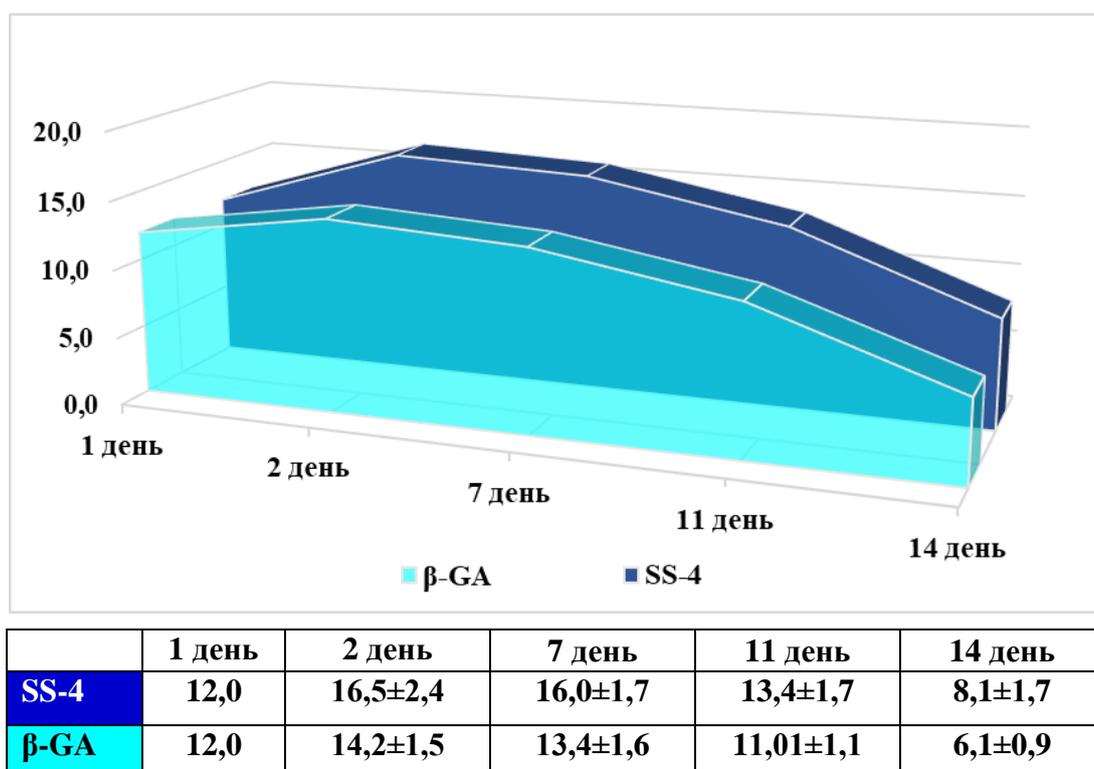


Рис. 3.13. Изменения площади поверхности ожоговой раны в различные сроки эксперимента в контрольной (SS-4) и экспериментальной (β -GA) группах ($M \pm SD$, $n=8$)

Таким образом, проведенные эксперименты позволили выявить ранозаживляющую способность 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты, возможные механизмы которого были раскрыты при исследовании ее антибактериальной активности в отношении к микрофлоре раневого отделяемого, определении изменений pH раневой поверхности и осуществлении цитологического анализа раневого экссудата в условиях термического ожога.

Результаты микробиологического исследования раневого отделяемого показали, что в экссудатах ожоговых ран контрольной и экспериментальной групп животных выявляются такие бактерии, как *Escherichia coli*, *Coagulase-negative staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* и *Pseudomonas aeruginosa* (табл. 3.2).

Таблица 3.2.

Влияние 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты, на микрофлору раневого отделяемого ожоговой раны в различные сроки исследования (n=8)

Условия эксперимента / Микрофлора	3-й день		7-й день		14-й день	
	Control	β -GA	Control	β -GA	Control	β -GA
<i>Escherichia coli</i>	+++	+	++	++	++	+
<i>Coagulase-negative Staphylococcus</i>	++++	++	+++	+	+	+
<i>Staphylococcus Aureus</i>	+	+	+++	++	+++	+
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	++	++	++	++	++	+
<i>Aspergillus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Proteus Mirabilis</i>	++	++	++	++	++	+

Примечание: «+» - единичные колонии;

«++» - скудный рост;

«+++» - умеренный рост;

«++++» - обильный рост бактерий.

Исследования, проведенные в различные периоды времени, показали, что при применении 10%-ой мази β -GA, в экссудатах экспериментальной группы животных подавлялся рост бактерий, которые выявлялись в контрольной группе с применением только

мазовой основы. Полученные результаты, по-существу, подтверждают многочисленные литературные данные относительно антибактериальной активности β -ГА. Так, на 3-й день в контрольной группе выявлялся интенсивный рост *Escherichia coli*, *Coagulase-negative staphylococcus*, также наблюдались единичные колонии плесневых грибов типа *Aspergillus*, чего не наблюдалось в экспериментальной группе. Однако, в тот же день эксперимента в обеих группах животных определялся скудный рост *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus mirabilis*, а также единичный рост *Staphylococcus aureus*.

На 7-й день опыта не удалось обнаружить изменения роста *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus mirabilis* ни в контрольной, ни в экспериментальной группах. В то же время в экспериментальной группе было зарегистрировано значительное снижение роста *Coagulase-negative staphylococcus*, однако при этом, значительное увеличение роста *Staphylococcus aureus* наблюдалось обеих в группах.

На 14-й день эксперимента у животных экспериментальной группы наблюдается уменьшение роста *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus mirabilis*, в то время как в контрольной группе практически не наблюдались изменения микробного роста (табл. 3.2.).

В ходе эксперимента не удалось получить данных, которые бы позволили судить о наличии антифунгальной активности β -ГА, так как с начала эксперимента в обеих группах животных практически не была определена грибковая флора.

Измерения pH раневой поверхности показали, что во все наблюдаемые сроки исследования (3-ьи, 7-е и 14-е сутки) в экспериментальной группе животных наблюдаются различия в значениях pH по сравнению с контрольной группой на 0,3 (с $7,16 \pm 0,16$ до $6,84 \pm 0,33$), 0,14 (с $7,16 \pm 0,41$ до $7,02 \pm 0,19$) ($p < 0,05$) и 0,3 (с $7,57 \pm 0,61$ до $7,23 \pm 0,39$) единиц соответственно.

Средние значения pH, измеренной на поверхности ожоговой раны, в контрольной и экспериментальной группах на 3-й, 7-й и 14-й дни эксперимента представлены на рис. 3.14.:

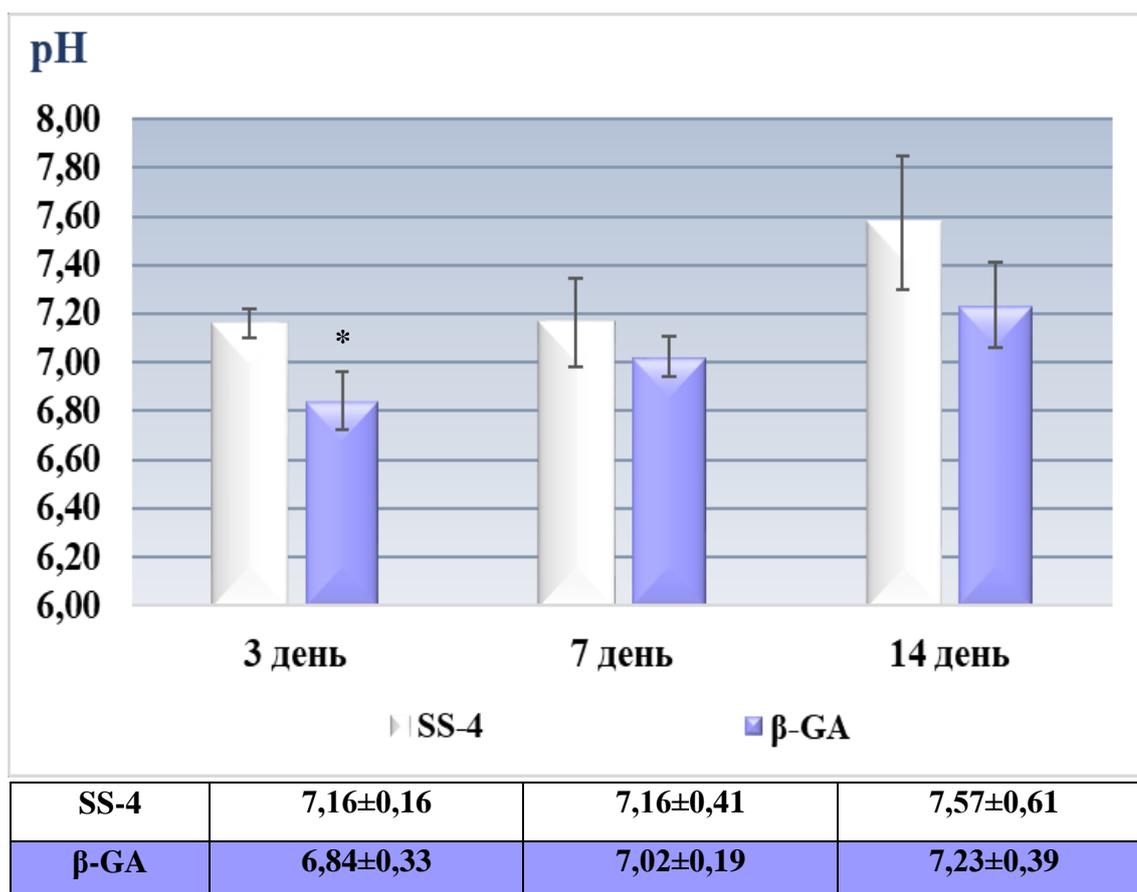


Рис. 3.14. Изменения рН поверхности раневой поверхности в контрольной (SS-4) и экспериментальной группах (β-GA) в различные сроки экспериментального ожога у крыс ($M \pm SD$, $n=8$, $*p < 0,05$ по сравнению с контрольной величиной)

Анализируя возможные факторы, способствующие изменениям рН раневой поверхности, наше внимание привлекли данные литературы, согласно которым [Dai T. et al, 2010] поверхность ожоговой раны служит хорошей средой для роста различных микроорганизмов, способствующих повышению активности ряда ферментов, таких как уреазы, протеазы и др. В свою очередь высокая уреазная активность *Proteus mirabilis* [McManus A.T. et al, 1982], приводит к накоплению аммиака и повышению рН. Повышение ферментативной активности оставляет вредоносное действие на процесс регенерации раны, подавляя грануляцию тканей и активность эндогенных биологически активных веществ таких, как факторы роста, цитокины и т.д. Этим, по всей вероятности, объясняется тот факт, что для поверхности ожоговой раны присуще более высокое значение рН по сравнению с неповрежденной кожей. В связи с этим в настоящее время для восстановления ожоговой раны большое значение придается регуляция рН.

Проведенные нами эксперименты по-существу полностью подтвердили вышесказанное, поскольку на протяжении всего периода применения 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты в экспериментальной группе были выявлены не только некоторое снижение роста *Proteus mirabilis*, но и снижение средних значений рН в сравнении с контрольной группой, что и свидетельствует о благоприятном действии мази на процессы регенерации ожоговой раны.

Эффективность 10%-ой мази β -GA на модели ожоговой раны, была оценена также при изучении клеточного состава раневого содержимого с подсчетом соотношения нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов и фибробластов, поскольку в преобладающем большинстве опубликованных экспериментальных исследований с целью описания особенностей отдельных фаз локального воспалительного процесса в мягких тканях ожоговой раны, авторы приводят цитограмму раневого экссудата [Ярец Ю.И., 2009].

Хорошо известно, что роль макрофагов в сопряжении экссудативной и пролиферативной фаз воспаления, регенерации и фиброза - неоспорима. Совместно с нейтрофилами они ограничивают пораженный участок тканей, формируя нейтрофильно-макрофагальный барьер по периферии зоны альтерации. Вначале в нем преобладают нейтрофилы, но впоследствии происходит изменение клеточного состава этого барьера на преимущественно макрофагальный, а затем на макрофагально-фибробластический, предшествующий формированию грануляционной ткани в очаге воспаления. Кроме того, макрофаги продуцируют различные цитокины и хемокины, стимулирующие рост новых капилляров и синтез коллагена. В то же время именно фибробласты, представляющие собой основные клетки, создающие структурную основу для формирования разных тканей в процессе регенерации после повреждения [Шурыгина И.А и соавт., 2012], действуют в последующей стадии воспаления. Они, являясь главными эффекторами репаративной фазы, интенсивно синтезируют белки внеклеточного матрикса и микроциркуляторной единицы, восстанавливают поврежденную дерму, на которой затем формируется эпидермис. Параллельно пролиферации фибробластов происходит новообразование сосудов.

Установлено, что лимфоциты эпидермиса также выполняют функцию регуляторов пролиферативной активности эпидермальных кератиноцитов. Активирование Т-лимфоцитов

в коже приводит к стимулированию пролиферативной активности эпидермальных кератиноцитов через общие клеточные механизмы, последние включают цитокины – ФНО, интерлейкины, факторы роста и др. [Рева И.В. и соавт., 2013].

Таблица 3.3.

**Цитограмма раневого экссудата в условиях применения 10%-ой мази
β-GA (M±SD, n=8)**

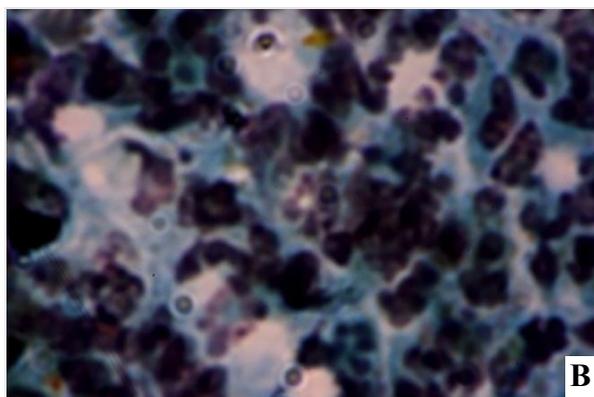
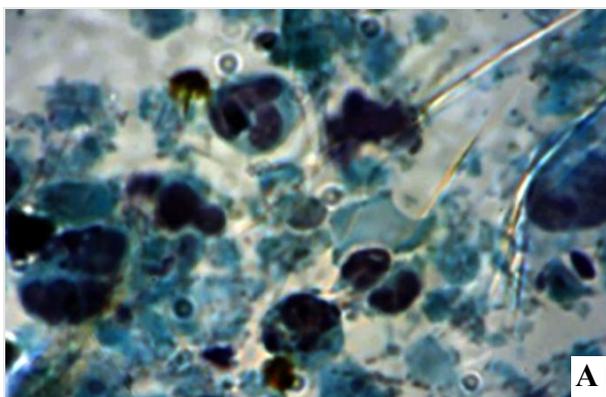
Период наблюдения	Исследуемая группа	Исследуемые показатели*			
		нейтрофилы	лимфоциты	макрофаги	фибробласты
3-ьи сутки	контроль	49,3±4,86	1,1±0,99	3,0±0,76	не обнаружено
	β-GA	32,5±2,07 <i>p<0,05</i>	6,6±1,06 <i>p<0,05</i>	4,1±1,13 <i>p<0,05</i>	не обнаружено
7-е сутки	контроль	31,6±2,60	3,2±1,64	4,0±1,00	1,0±0,71
	β-GA	22,6±1,14 <i>p<0,05</i>	3,0±1,00 <i>p>0,05</i>	3,7±1,21 <i>p>0,05</i>	3,6±0,89 <i>p<0,05</i>
11-е сутки	контроль	21,8±3,56	0,8±0,84	18,2±1,92	11,0±2,00
	β-GA	16,2±1,30 <i>p<0,05</i>	1,8±0,84 <i>p>0,05</i>	28,3±1,51 <i>p<0,05</i>	23,2±2,86 <i>p<0,05</i>
14-е сутки	контроль	24,2±1,64	2,0±1,00	23,0±0,71	18,4±2,07
	β-GA	13,4±1,95 <i>p<0,05</i>	7,4±1,34 <i>p<0,05</i>	28,7±2,16 <i>p<0,05</i>	25,8±1,30 <i>p<0,05</i>

* - данные представлены в пересчете на 100 клеток.

Согласно полученным результатам проведенного цитологического анализа раневого содержимого (табл. 3.3.), в контрольной и экспериментальной группах на 3-ьи сутки опыта наблюдались большие скопления нейтрофильных лейкоцитов, количество которых составило соответственно 92,3% и 75,1% от общего числа исследуемых клеток раневого содержимого в указанный день эксперимента, что свидетельствует об активизации воспалительных реакций в пораженных участках тканей. Клетки лимфоцитов и макрофагов

наблюдались гораздо реже: их количество в контрольной группе составляло 2,1% и 5,6%, а в экспериментальной группе 15,3% и 9,5% соответственно от общего числа клеток раневого экссудата. В то же время при морфометрическом анализе в указанный период наблюдения в обеих исследуемых группах не были обнаружены клетки фибробластического ряда.

Сравнительный анализ клеточного состава раневого экссудата на 7-е сутки моделирования ожоговой раны в обеих исследуемых группах показал, что наблюдается уменьшение количества лейкоцитов по сравнению с предыдущим сроком исследования. Особенно выраженными оказались изменения числа клеток фибробластического ряда экспериментальной группы животных, где было зарегистрировано превышение их количества в 3,6 раза по сравнению с контрольной группой. Следует отметить, что в раневом экссудате животных экспериментальной группы были выявлены клетки лейкоцитарного ряда, структура которых в целом была сохранена (рис. 3.15.C, D), в то время как у крыс контрольной группы того же срока наблюдения обнаруживались подобные клетки в основном с признаками распада и дистрофии (рис. 3.15.A, B). В контрольной группе прослеживалось некоторое повышение числа лимфоцитов и макрофагов, в то время как в экспериментальной группе наблюдалось понижение содержания клеток лимфоидного ряда, что свидетельствует о хронизации воспалительного процесса. В указанный период исследования в раневом содержимом ожоговых ран обеих групп выявлялись молодые клетки фибробластического ряда.



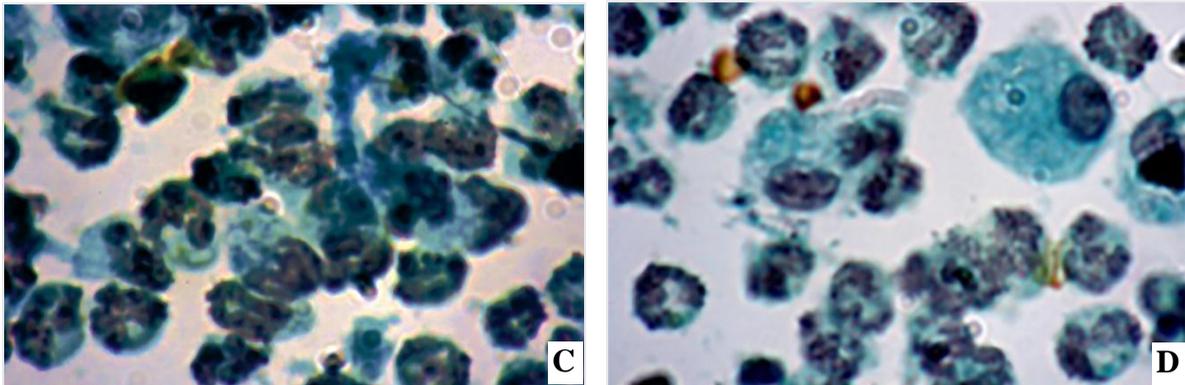


Рис. 3.15. Клеточный состав содержимого ожоговой раны на 7-е сутки локального воспалительного процесса в контрольной и экспериментальной группах исследования:

А - контрольная группа: в экссудате доминируют клетки лейкоцитарного ряда (полиморфноядерные нейтрофилы) с признаками дистрофии и распада;

В – контрольная группа: дистрофически измененные фибробласты, плазматические, лимфоидные и макрофагальные элементы;

С – экспериментальная группа: нейтрофильные лейкоциты и лимфоидные клетки без выраженных признаков дистрофии;

Д - экспериментальная группа: в экссудате обнаруживаются клетки фибробластического ряда.

Окраска - по Папаниколау.

Увеличение - ок. 10 x об. 100 (иммерсия).

Подсчет клеток на 11-е и 14-е сутки исследования показал значительное понижение числа лейкоцитов по сравнению с аналогичными показателями на 3-ьи сутки эксперимента: в контрольной группе - с $49,3 \pm 4,86$ до $24,2 \pm 1,64$, а в экспериментальной группе - с $32,5 \pm 2,07$ до $13,4 \pm 1,95$, что свидетельствует о хроническом характере течения патологического процесса в указанный срок эксперимента. Более того, на 14-е сутки опыта в экспериментальной группе определялись более высокие показатели для лимфоцитов ($7,4 \pm 1,34$) и макрофагов ($28,7 \pm 2,16$) по сравнению с таковой контрольной группы ($2,0 \pm 1,00$ и $23,0 \pm 0,71$ соответственно).

При анализе клеток фибробластического ряда обнаружилось, что содержание этих клеток на 11-й и, особенно, 14-й дни эксперимента значительно превосходят их уровни в контрольной и экспериментальной группах в отличие от предыдущих периодов наблюдения

(рис. 3.16.А, В). Одновременно для указанных сроков наблюдения было характерно превышение количества клеток фибробластического ряда в раневых содержимых животных экспериментальной группы по сравнению с контрольной в 2,1 и 1,4 раза соответственно. Кроме того, в раневом экссудате наряду с фибробластами, встречались также более дифференцированные клетки – фиброциты (рис. 3.16.А, В).

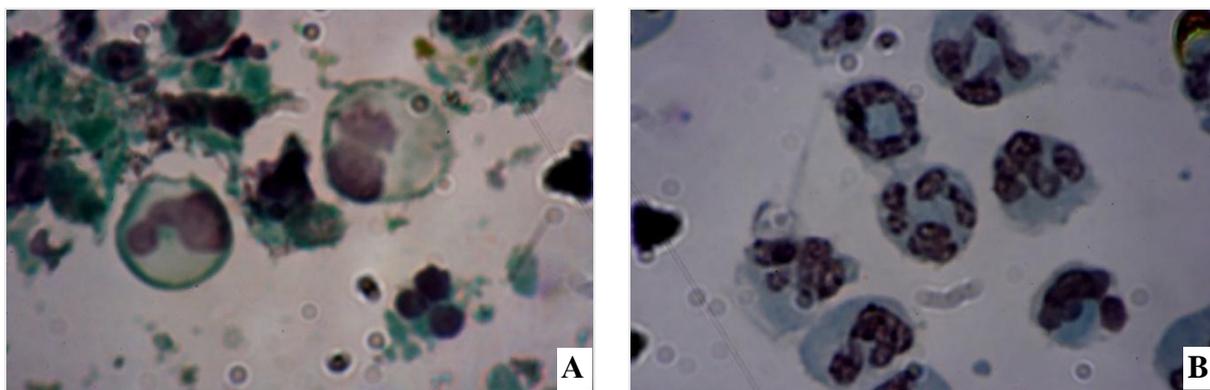


Рис. 3.16. Клеточный состав экссудата области ожоговой раны на 14-е сутки локального воспалительного процесса в экспериментальной группе исследования:

А, В - в экссудате доминируют лимфоидные и макрофагальные элементы, наблюдаются юные и зрелые клетки фибробластического ряда.

Окраска - по Папаниколау.

Увеличение - ок. 10 х об. 100 (иммерсия).

Таким образом, при анализе мазков-отпечатков было установлено, что использование 10%-ой мази β -GA в значительной степени способствует благоприятному течению репаративной регенерации. На фоне ее применения в меньшей степени происходило вовлечение в рану клеток нейтрофильно-макрофагального звена, и, как следствие, имела место меньшая выраженность воспалительной реакции при отторжении тканей и созревании грануляций.

По данным цитогрaмм в экспериментальной группе воспалительный процесс в ожоговой ране стихал в более ранние сроки; снижение содержания нейтрофильных лейкоцитов и лимфоцитов в составе клеточной популяции на раневой поверхности отмечалось уже на 7-е сутки эксперимента (рис. 3.17.). На этом фоне пролиферативная фаза

раневого процесса по сравнению с контрольной группой была более выраженной, о чем свидетельствует высокое содержание фибробластов в отпечатках ран на 7-14-е сутки эксперимента.

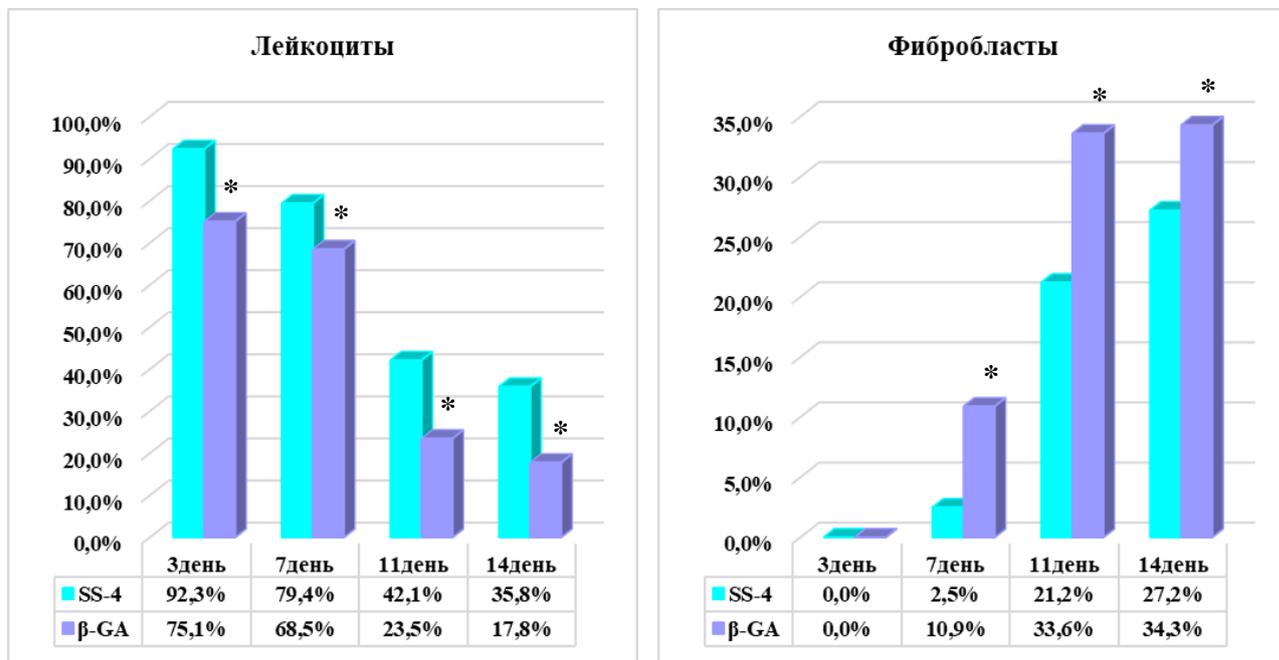


Рис. 3.17. Содержание лейкоцитов (А) и фибробластов (В) в процентах от общего числа клеток раневого экссудата в контрольной и экспериментальной группах (n=8, *p<0,05 по сравнению с контрольной величиной)

Таким образом, проведенные исследования по изучению особенностей цитограммы раневого экссудата в условиях местного применения 10%-ой мази β-GA не только подтвердили наличие у исследуемой мази противовоспалительных свойств, но и позволили выявить некоторые механизмы описанного действия: исследуемая кислота способствует ингибированию экссудативных реакций воспаления, и активации местных фибробластических процессов, приводящих к укорочению сроков заживления раны.

По существу, полученные данные относительно способности 10%-ой мази β-GA сокращать длительность воспалительного процесса и стимулировать пролиферативную фазу раневого процесса, наряду с представленными выше данными относительно способности препарата уменьшать инфицирование ожоговых ран, полностью подтверждают его ранозаживляющее действие.

3.4. Влияние β -глицирретиновой кислоты на морфологические сдвиги в пульпе зубов

β -глицирретиновая кислота, обладая широким спектром фармакологической активности, входит в состав комбинированных лекарственных форм, которые доказали свою эффективность при лечении различных патологий полости рта. При этом доказательная база, подтверждающая способность β -GA корректировать морфологические изменения, наблюдаемые при тех или иных нарушениях целостности слизистой ротовой полости, отсутствует. В связи с этим было исследовано влияние β -глицирретиновой кислоты на морфологические сдвиги в пульпе зубов на модели экспериментальной гиперестезии.

Хорошо известно, что малейшие нарушения гистиоструктуры пульпарной ткани, где происходит процесс дентинообразования, могут сопровождаться изменениями той или иной функции пульпы, приводя к нарушению нормальной функциональной деятельности зуба в целом.

Проведенные нами эксперименты, как и следовало ожидать, показали, что интактная пульпа зуба представляет собой рыхлую волокнистую соединительную ткань, в состав которой входят многочисленные клетки с различными функциями и межклеточное вещество (рис. 3.18.). В пульпарной ткани выявляются клетки в виде одонтобластов, фибробластов, макрофагов, тучных клеток, мало дифференцированных клеток, лимфоцитов, гистиоцитов и др.

Одонтобласты выявляются в виде плотного слоя в периферической зоне пульпы, где между ними отмечаются механические и щелевидные контакты. Их отростки проникают внутрь дентинных канальцев (рис. 3.18.А, В). Слой одонтобластов разделен от предентина пульподентинной линией. В пульпе интактных зубов крыс выявляются структуры с нечеткими разграниченными слоями (рис. 3.18.А) – это периферический или одонтобластический слой, где снаружи определяется предентин и промежуточный или субодонтобластический слой, который в свою очередь имеет три зоны: наружная зона (слой Вейля) – бедная клетками, здесь располагается сеть нервных волокон (сплетение Рашкова), и кровеносными капиллярами; внутренняя зона – богатая клетками; центральный слой – представлен рыхлой соединительной тканью, богатой кровеносными и лимфатическими

сосудами (рис. 3.18.C), а также нервными стволиками. Межклеточное вещество богато кровеносными сосудами и дендритными клетками.

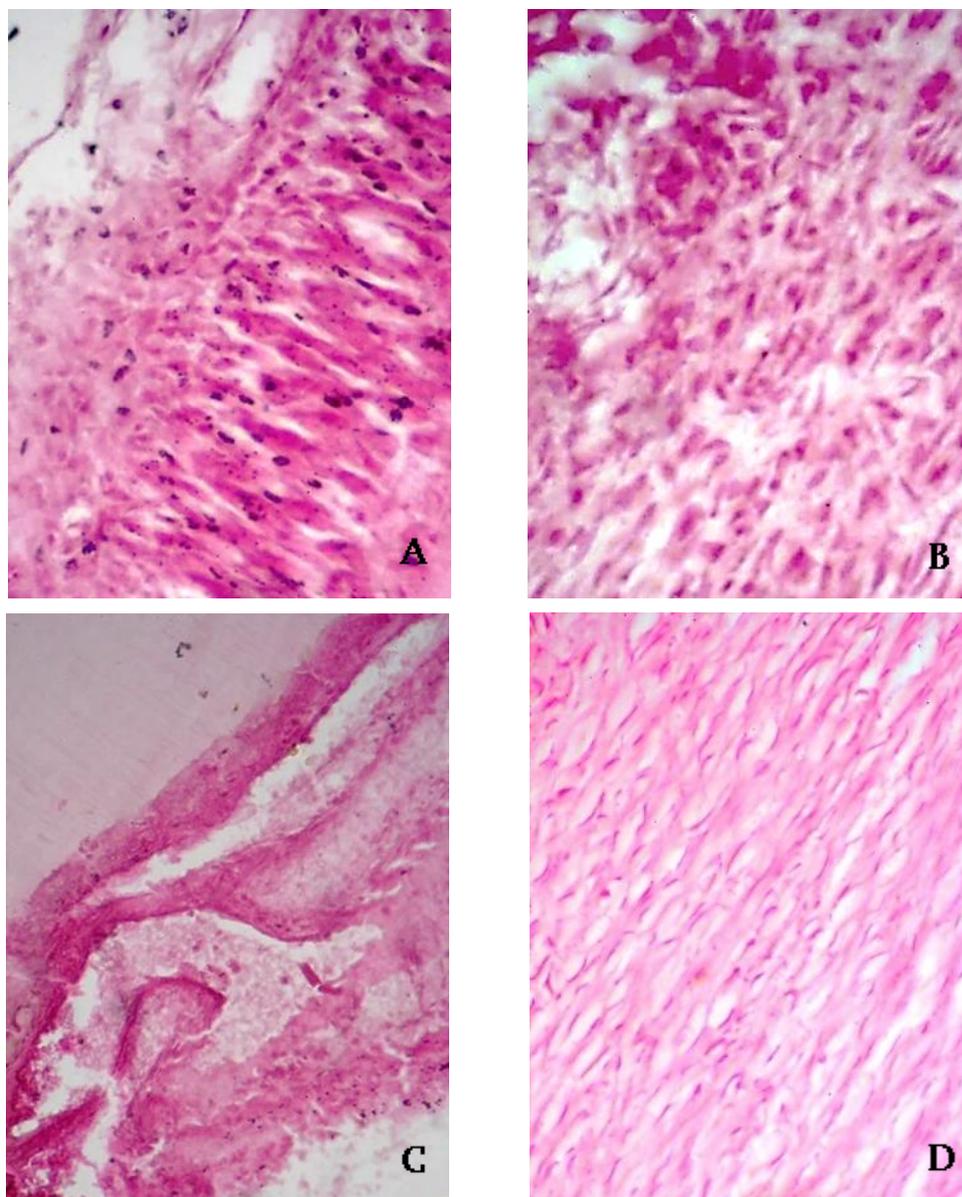


Рис. 3.18. Пульпарная ткань интактной группы животных:

A – одонтобластический и субодонтобластический слои пульпы;

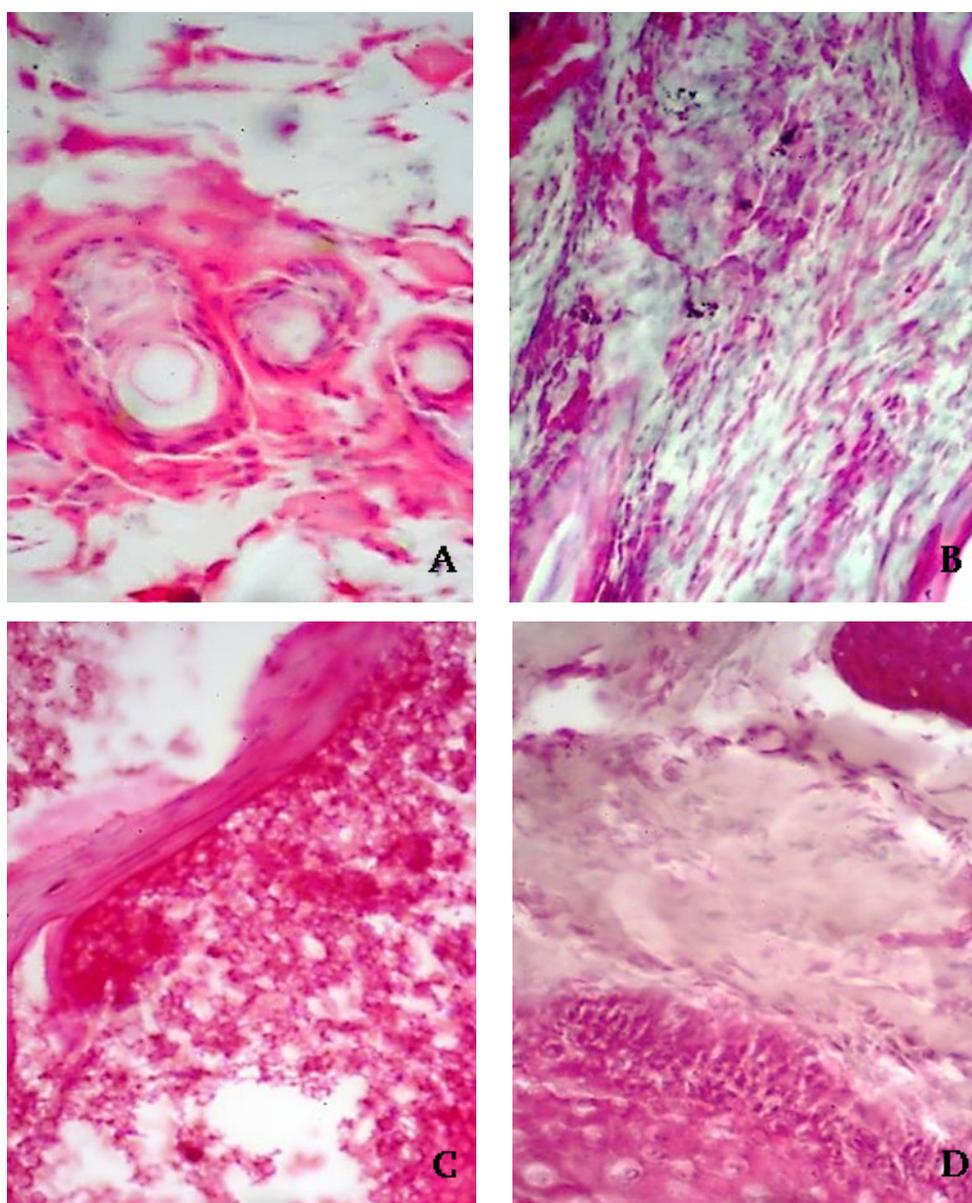
B – слой одонтобластов в периферической зоне пульпы;

C – центральный слой пульпы с лимфатическими и кровеносными сосудами; D – корневая пульпа с плотными коллагеновыми волокнами.

Окраска - гематоксилин-эозином.

Увеличение - ок. 10 × об. 25 (A, B); ок. 10 × об 12,5 (C, D).

Гистологические исследования пульпы и околопульпарной ткани животных с экспериментальной гиперестезией показали, что в пульпе поврежденных зубов крыс выявляется ряд морфогистологических нарушений. Так, по сравнению с интактной группой, наблюдаются гиперемия и отек коронковой части пульпы, обнаруживаются отдельные лейкоциты (рис. 3.19.А, В). Вместе с дисконкомплексацией пульпарной ткани, наблюдается процесс миграции одонтобластов, определяется разрастание рыхлой соединительной ткани вглубь пульпы (рис. 3.19.С, D). По всей поверхности нарушены гистиоструктуры преддентина и дентина в виде дисконкомплексации (рис. 3.19.Е, F).



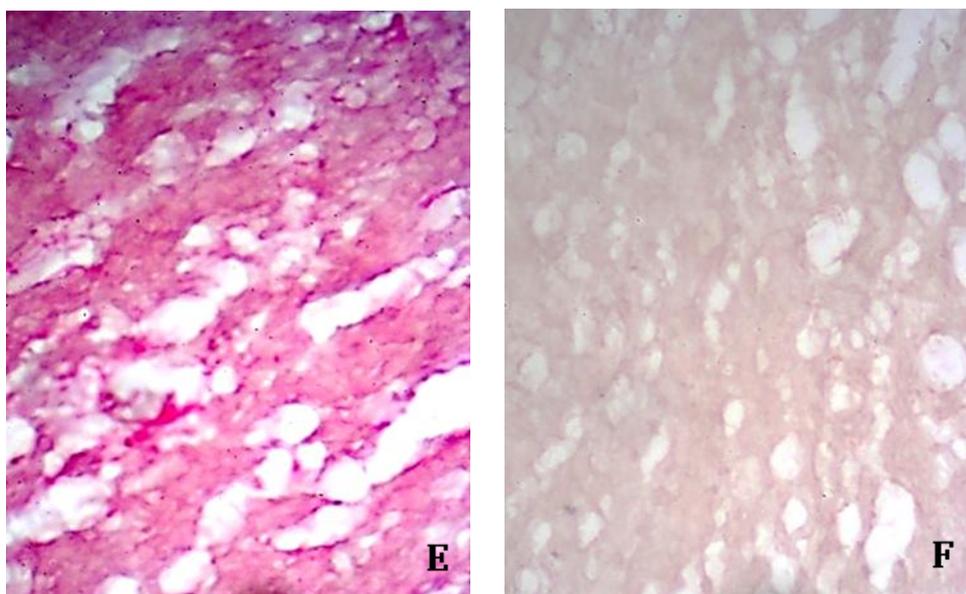


Рис. 3.19. Пульпарная и околопульпарная ткани контрольной группы (I группа) животных:

А – гиперемия и отек коронковой части пульпы; **В** – отдельные лейкоциты в пульпарной ткани; **С** – признаки стаза крови и дискомплексации пульпарной ткани; **Д** – разрастание соединительной ткани с мигрированными одонтобластами; **Е, F** – дискомплексация дентина и предентина.

Окраска - гематоксилин-эозином.

Увеличение - ок. 10 × об. 25 (А, В, D, E, F); ок. 10 × об. 12,5 (С).

Прежде чем оценить эффективность β -GA, нанесенной на поверхность дентина в виде раствора в DMSO, при исследуемом патологическом процессе, гистологические изменения были оценены и под влиянием самого раствора DMSO.

У группы животных, зубы которых были обработаны раствором DMSO на фоне гиперестезии, выявляется почти аналогичная с контрольной группой животных морфологическая картина. Более того, на фоне разрастания рыхлой соединительной ткани, отмечаются пролиферативные процессы, а в центральной части пульпарной ткани развиваются альтеративные процессы (рис. 3.20.А, В). Предентинный слой почти не выявляется, дентин разрушен (рис. 3.20.С, D). Иная картина наблюдается при аппликации β -GA, растворенной в DMSO, в условиях гиперестезии. По сравнению с пульпой зубов животных предыдущих групп отмеченные патогистологические нарушения проявляются намного слабее.

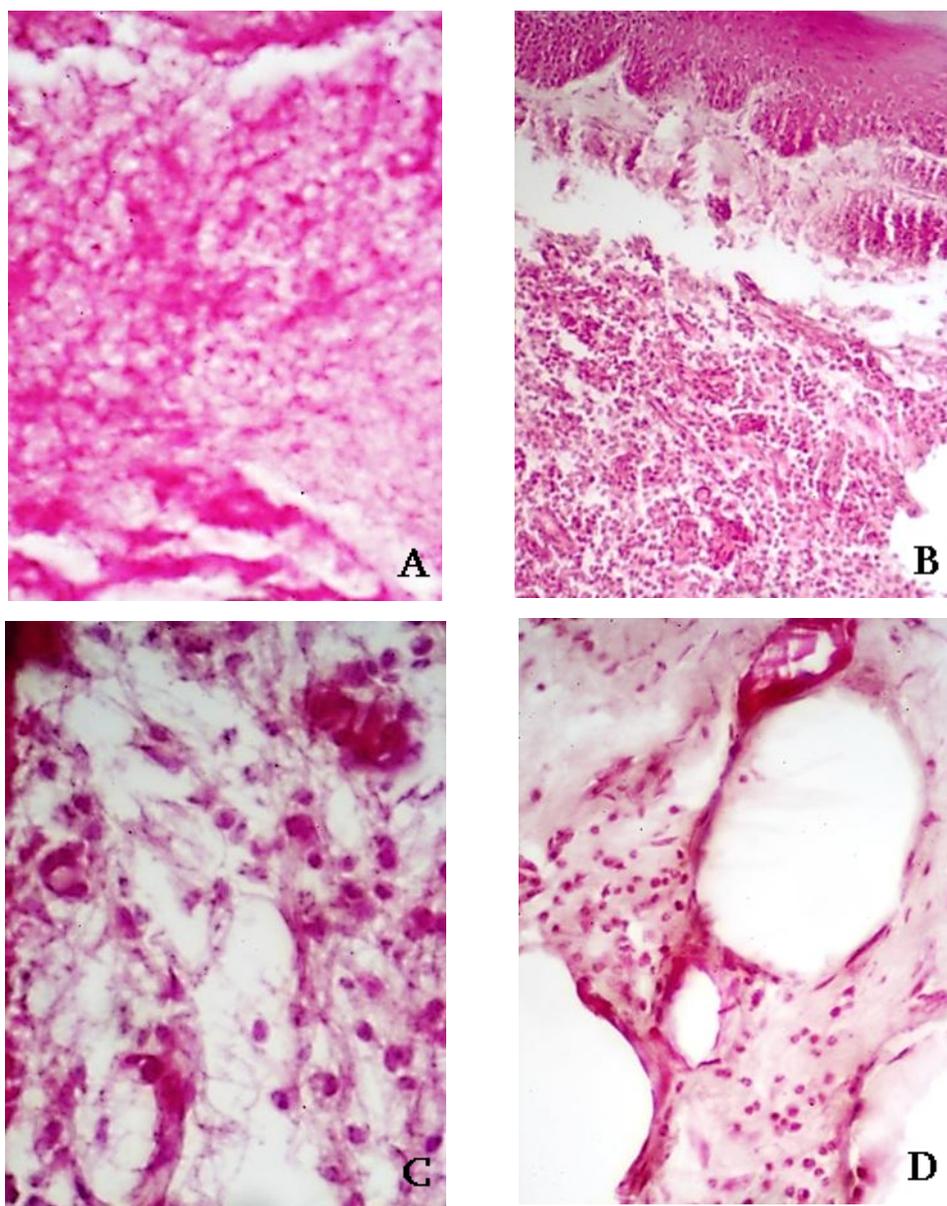


Рис. 3.20. Пульпарная и околопульпарная ткани животных, обработанные DMSO (II группа).

- A – разрастание рыхлой соединительной ткани в пульпе;**
 - B – альтеративные процессы в центральной части пульпы;**
 - C, D – участки разрушенного дентина.**
- Окраска - гематоксилин-эозином.**
- Увеличение - ок. 10 × об. 12,5 (A, B); ок. 10 × об. 25 (C, D).**

Так, происходит сравнительное восстановление гистиоструктуры в пульпарных и околопульпарных тканях зубов (рис. 3.21.A, B). В дентине зубов этой группы выявляются оформленные дентиновые каналы, однако местами в дентиновой ткани регистрируются мелкие очаги деструктивных процессов (рис. 3.21.C).

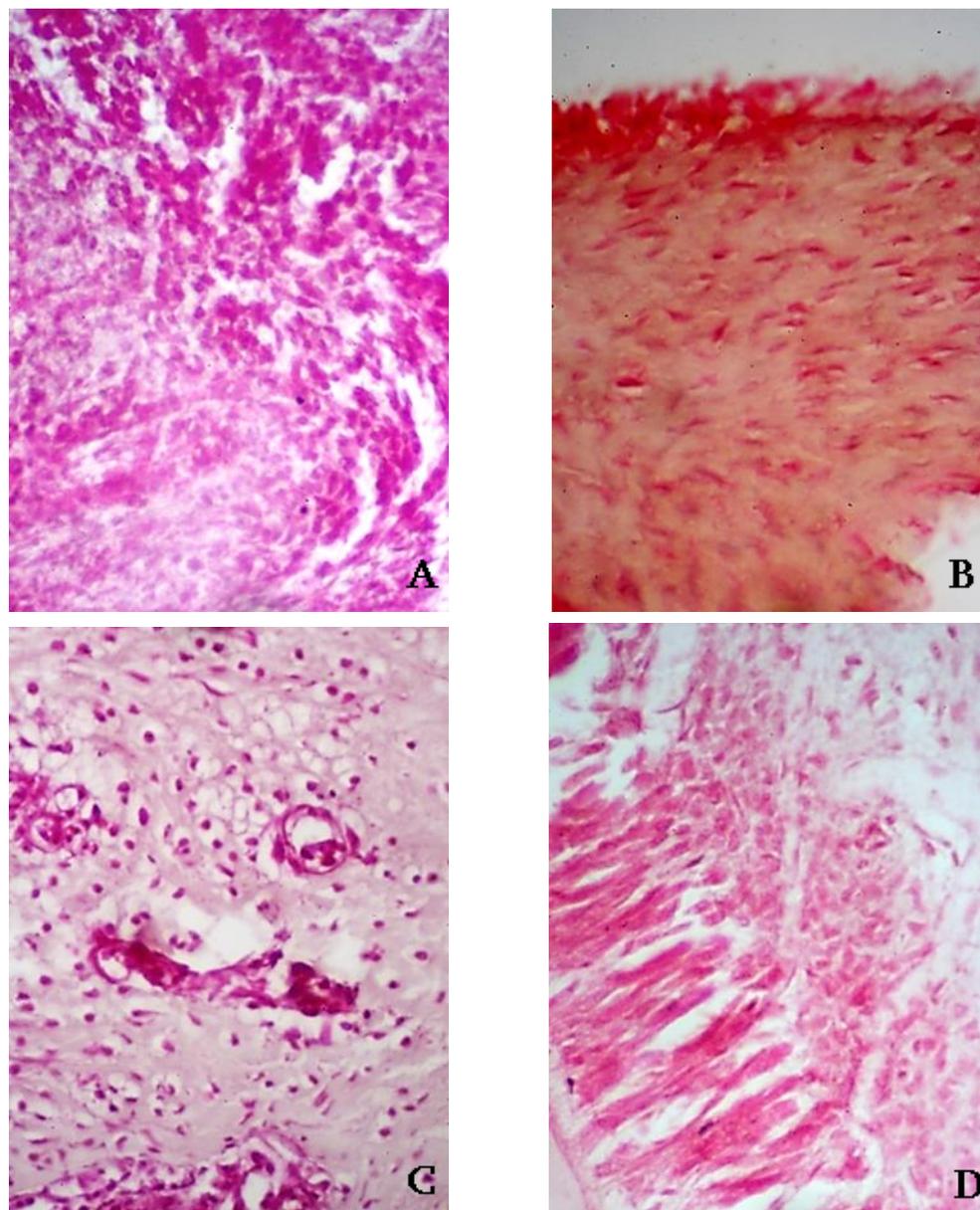


Рис. 3.21. Пульпарная и околопульпарная ткани животных, обработанных β -ГА (III группа):

А – частично восстановленная пульпарная ткань; В – восстановленная пульпарная ткань с одонтобластами; С – оформленные дентинные каналы с небольшими деструктивными очагами; D – восстановленные дентинные и предентинные слои.

Окраска - гематоксилин-эозином.

Увеличение - ок. 10, \times об. 25 (А, В, С, D).

Рыхлая волокнистая ткань в основном сохранена. Хорошо просматриваются предентинный и дентиновые слои и, хотя в центральной части пульпарной ткани отмечаются деструктивные процессы, они значительно менее выражены по сравнению с теми же показателями животных I и II групп (рис. 3.21.D). Кроме того, после аппликации β -ГА

расстройства крово- и лимфообращения, дистрофические и некротические процессы в пульпарной ткани выражены незначительно.

Таким образом, полученные патогистоморфологические данные показывают, что β -GA обладает способностью предотвращать и подавлять развитие патологических процессов в тканях зубов, что проявляется уменьшением в них деструктивных и дистрофических изменений, вызванных обнажением дентина, а также восстановлением морфофункциональной целостности пульпарных и околопульпарных тканей. Полученные результаты в совокупности с данными относительно высокой и разнонаправленной фармакологической активности β -GA, могут явиться основой для создания новых средств коррекции изменений, сопровождающихся гиперестезией твердых тканей зубов, как в виде монотерапии, так и в виде комбинированных препаратов терапии различных патологий ротовой полости.

3.5. Клиническое исследование и микроскопическая характеристика патологических состояний слизистой оболочки полости рта и пародонта в динамике лечения препаратом “Ангиноваг”, содержащим β -глицирретиновую кислоту

Данные, доказывающие способность β -GA устранять морфологические сдвиги в условиях экспериментальной гиперестезии зубов крыс, были подтверждены также и результатами клинического исследования с использованием препарата “Ангиноваг”, содержащего β -глицирретиновую кислоту.

Исследования, проведенные на 62 пациентах с учетом половых различий, возраста и нозологии (табл. 2.1 и 2.2), показали, что стоматологический статус больных, получавших “Ангиноваг” имеет положительные сдвиги: длительность сроков заживления и эпителизации слизистой оболочки полости рта больных основной группы по отношению к группе сравнения, получавших общепринятую терапию, намного укорачиваются. Так, если без применения препарата отмечалось заживление в течение 2-3 недель, то в условиях применения “Ангиноваг”-а указанный срок укорачивался до 5-7 дней. Отмеченный положительный результат при лечении пациентов “Ангиноваг”-ом был подтвержден цитологическим анализом.

С целью определения качественного состава клеточных элементов смыва и содержимого зубодесневых карманов топографических зон ротовой полости были исследованы мазки из осадка с последующей фиксацией и окраской по Романовскому-Гимзе. При этом

оценивались фагоциты, лимфоциты и лейкоциты, а также дифференциация эпителиальных клеток по степени зрелости (базальноклеточные и ороговевающие), поскольку по интенсивности миграции лейкоцитов и десквамации эпителия слизистой оболочки полости рта можно судить о реактивности слизистой оболочки ротовой полости, а также степени тяжести патологического процесса. Микроскопическое исследование смыва и содержимого зубодесневых карманов топографических зон ротовой полости больных с выявленной патологией пародонта (таб. 2.2) показало, что до лечения в мазках обнаруживались эпителиальные клетки, единичные нейтрофилы, лимфоциты, эритроциты. Эпителиальные клетки выявлялись от 1 до 4-х единиц в поле зрения. Обнаруживались также единичные лейкоциты и кокки (рис. 3.22.).

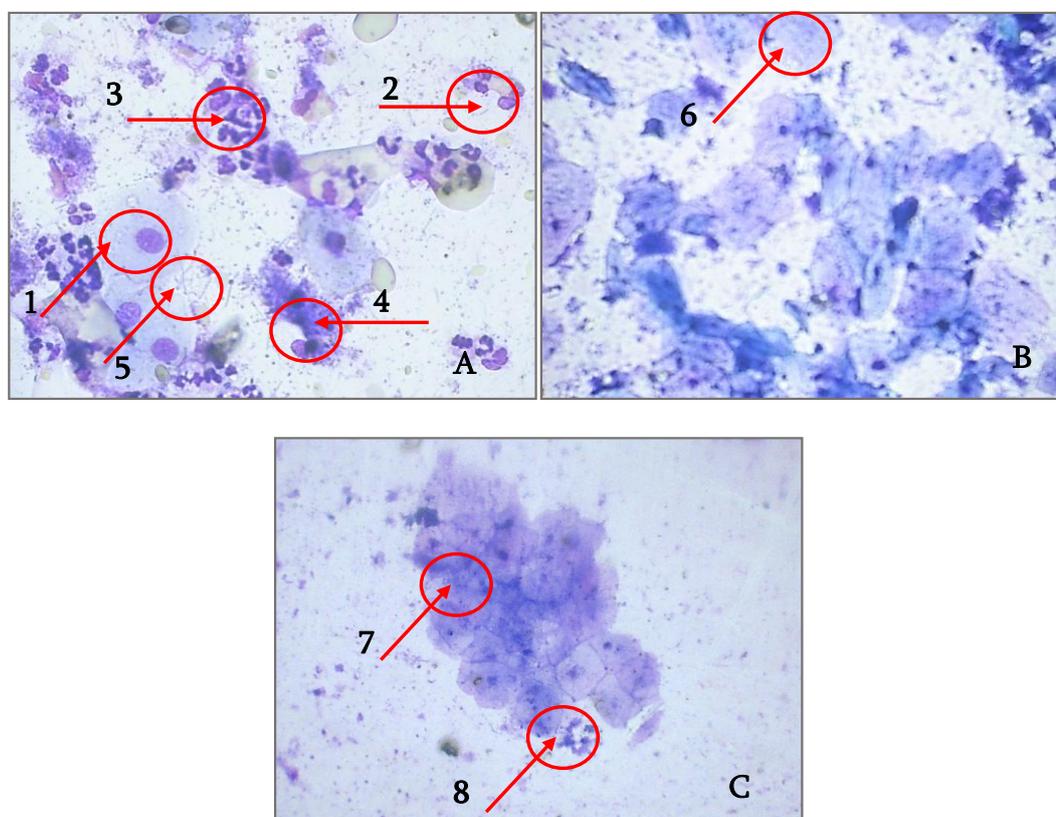


Рис. 3.22. Микрофлора слизистой оболочки полости рта и пародонтальных карманов до лечения: эпителиальные клетки (1), лимфоциты (2), лейкоциты (3), кокки (4), спирохеты (5)(А) и эпителиальные клетки (6) (на поверхности которых нет адсорбции микроорганизмов) (В), дистрофированные эпителиальные клетки (7) и лейкоциты (8) (С).

Окраска - по Романовскому-Гимзе.

Увеличение - (А, В, х 40; С х 400).

В мазках больных после лечения “Ангиноваг”-ом (1-2 впрыскивания через каждые 2-3 часа) при микроскопии были отмечены ощутимые изменения. Так, в полях зрения обнаруживались от 8 до 20 единиц эпителиальных клеток, местами выявлялись пласты эпителия с признаками кератинизации (рис. 3.23.В). Характер окрашивания мазков указывал также и на взаимоотношение микрофлоры полости рта с эпителиальными клетками. Так, были отмечены адсорбированные на поверхности эпителиальных клеток кокки, что свидетельствуют об эффективности лечебных мероприятий (рис. 3.23.А).

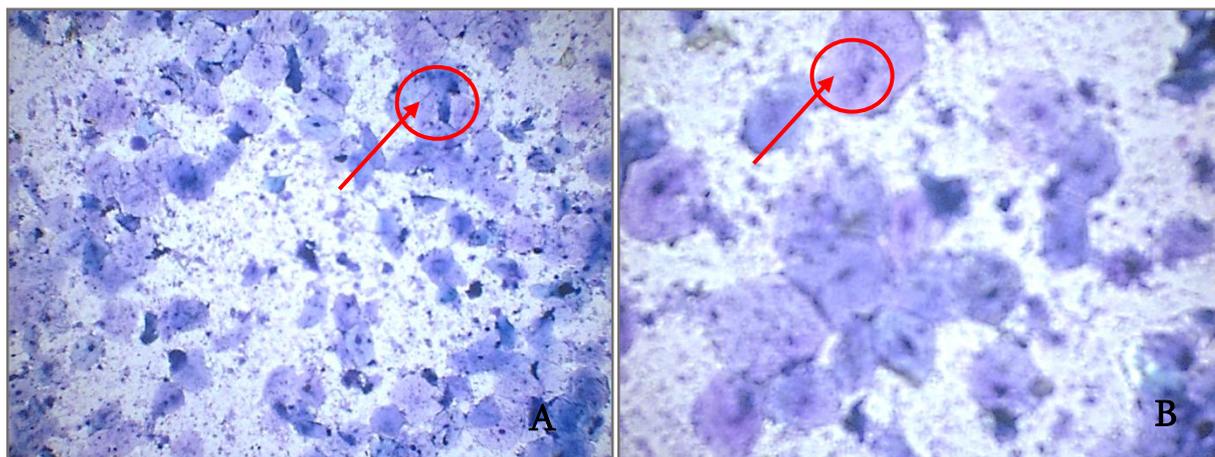


Рис. 3.23. Микроскопическая характеристика слизистой оболочки полости рта после лечения “Ангиноваг”-ом: адсорбция эпителиальной клеткой большого количества кокков (А), пласты эпителиальных клеток с признаками кератинизации (В).

Окраска - по Романовскому-Гимзе.

Увеличение - (А x 200; В x 400).

Представленная микроскопическая картина свидетельствует о повышении барьерной функции слизистой оболочки полости рта, на что указывают увеличение количества и степень кератинизации эпителиальных клеток. О повышении защитной функции на фоне применения “Ангиноваг”-а можно судить и по обнаружению в цитоплазме некоторых макрофагов фагоцитарных частиц, выявление которых наряду с нейтрофильными лейкоцитами и моноцитами, подтверждает инициацию фагоцитарной активности (рис. 3.24.).

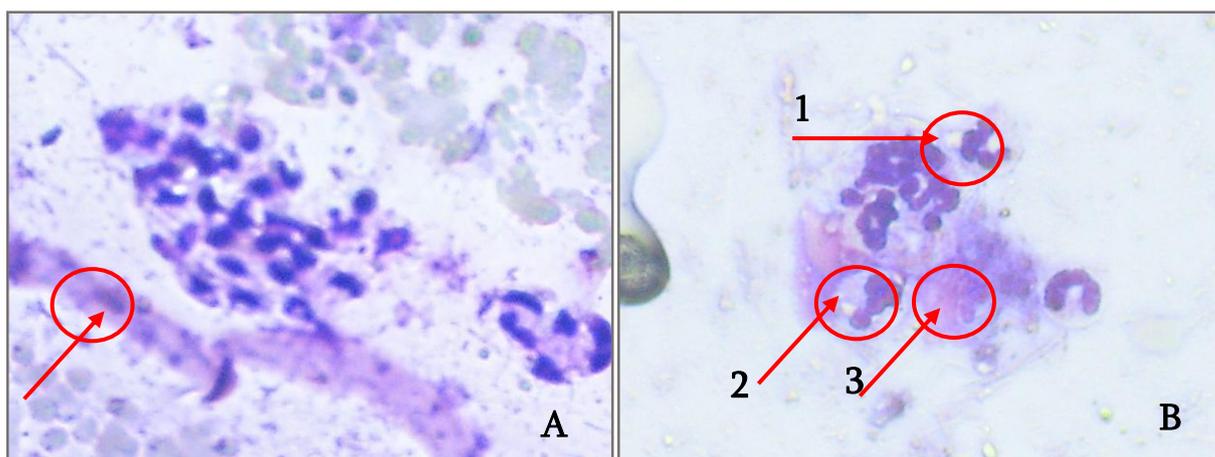


Рис. 3.24. Микроскопическая характеристика слизистой оболочки полости рта после лечения “Ангиноваг”-ом: кератинизация эпителиальных клеток (А), нейтрофильные лейкоциты (1), макрофаги (2), фагоцитарные частицы (3) (В).

Окраска - по Романовскому-Гимзе.

Увеличение - (А x 400; В x 400).

Таким образом, проведенный цитологический анализ выявил, что наблюдаемое укорочение сроков заживления и эпителизации в условиях применения препарата “Ангиноваг”, обладающего противовоспалительным и обезболивающим действием, основано на его способности стимулировать фагоцитарную активность нейтрофильных лейкоцитов и моноцитов. В результате, при стоматитах, герпетических и грибковых поражениях уменьшается, а во многих случаях и отсутствует кровоточивость из десен, наблюдаемая при патологиях пародонта. Несомненно, в реализации описанных эффектов задействована способность β -GA воздействовать на клеточные структуры с абортацией митотической активности патогенных клеток в эпителиальных тканях.

Полученные положительные клинические данные подтверждаются цитологическими исследованиями и являются доказательной основой эффективности препарата “Ангиноваг” при различных патологиях слизистой оболочки полости рта и пародонта, что расширяет показания для его применения в клинике терапевтической стоматологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наблюдаемая в последние годы тенденция повышения значимости фитотерапии ("гербализма") в современной медицине [Pathania S. et al., 2015; Enioutina E.Y. et al., 2017; Liu S.J. et al., 2018], несомненно обусловлена с одной стороны накопленными за последние годы данными доказательной медицины, подтверждающими эффективность препаратов растительного происхождения [Rajaratnam M. et al., 2014], с другой – выявлением на новом уровне механизмов их фармакологической активности, научно обосновывающим целесообразность их применения [Самбукова Т.В. и соавт., 2017].

Возрастающий интерес к растительным препаратам продиктован богатым составом растений фармакологически активными соединениями, что определяет широкий спектр их терапевтического действия и комплексное влияние на органы и системы организма [Krafta K. et al., 2014]. Уникальные свойства этих препаратов обеспечивают достаточно высокую эффективность применения при сравнительно низкой токсичности и небольшом количестве проявляемых побочных эффектов по сравнению с синтетическими препаратами. В указанном плане роль препаратов растительного происхождения, действующих одновременно на несколько звеньев патологического процесса, неоценима при лечении полиэтиологических заболеваний, в том числе и патологий, сопровождающихся болью и воспалением [Yang Y. et al., 2013]. Не менее важным является разработка фитопрепаратов для лечения ряда заболеваний, вызванных патогенными бактериями, принимая во внимание актуальность проблемы развития резистентности микроорганизмов к синтетическим противомикробным средствам [Rossiter S.E. et al., 2017].

Все вышесказанное явилось основой для исследования свойств и механизмов фармакологического действия β -глицирретиновой кислоты, которая ввиду широкого спектра фармакологической активности входит в состав комбинированных препаратов. При этом доказательная база научного обоснования проявляемых ею эффектов недостаточна, что ограничивает возможности разработки новых препаратов на основе β -ГА.

В связи с этим, целью предпринятого исследования явилась оценка эффективности β -ГА в устранении воспалительного процесса и боли с выявлением особенностей ее действия. Для осуществления поставленной цели была исследована антиноцицептивная активность β -

GA и гистологически оценена протекторная способность при экспериментальной гиперестезии дентина, было изучено противовоспалительное действие с морфологическим обоснованием полученных данных. На основе результатов исследования были апробированы также и лекарственные формы, содержащие β -GA, с исследованием ранозаживляющего действия и антибактериального спектра (10%-ая мазь β -GA) и изучением микроскопической характеристики патологических состояний слизистой оболочки полости рта и пародонта в динамике лечения препаратом «Ангиноваг», в состав которого входит β -GA.

При исследовании противовоспалительной активности β -GA на модели острого воспаления уха крыс, индуцированного ксилолом, по изменению массы воспаленного уха с гистологической оценкой очага воспаления, была установлена противовоспалительная активность β -глицирретиновой кислоты. Примечательно, что выявленный эффект β -GA носит дозозависимый характер, о чем свидетельствует превалирование эффектов препарата в дозе 100 мг/кг по сравнению с его применением в дозе 10 и 25 мг/кг. Так, при исследовании β -GA в дозе 100 мг/кг наблюдается подавление воспалительного процесса, что приводит к статистически значимому понижению разности масс воспаленного и интактного уха животных на $88,4 \pm 5,1$ мг, что свидетельствует о предотвращении индуцированного ксилолом процесса воспаления на 51,0%.

При сравнении противовоспалительной активности β -GA с аналогичными эффектами ASA (ацетилсалициловой кислоты) и диклофенака натрия выяснилось, что в дозах 10 и 25 мг/кг β -GA по своей противовоспалительной активности сравнима с эффектами ASA, а в дозе 100 мг/кг - превосходит действие ASA. Сравнительная оценка эффектов противовоспалительного действия с диклофенаком натрия показала, что препарат по своей способности предотвращать процесс воспаления, уступает противовоспалительной активности диклофенака натрия.

Подтверждением результатов, полученных в описанной серии экспериментов, послужили данные гистологической оценки срезов тканей воспаленного ксилолом уха крысы в контрольной группе животных и после предварительного введения ASA, диклофенака натрия и β -GA. При микроскопировании срезов тканей, окрашенных гематоксилином-эозином по методу Ван-Гизона было выявлено, что внутрибрюшинное введение β -GA в дозе 100 мг/кг за 30 мин до аппликации ксилола способствует ослаблению воспалительного

процесса не только по сравнению с морфологической картиной срезов тканей воспаленного уха, полученных в контрольной группе, но и после применения ASA. Об этом свидетельствует сравнительная сохранность хрящевой ткани и поперечнополосатой мускулатуры, а также четкое выявление сосудистой системы и волосяных фолликулов (хотя и наблюдались некоторые патологические изменения, такие как: очаги жировой дистрофии, инфильтрации в железах и фолликулах, а также очаги некроза, окруженные соединительнотканными клетками).

Таким образом, представленные данные не оставляют сомнения о наличии у β -GA противовоспалительной активности. Между тем хорошо известно, что для соединений с указанной активностью характерно также и проявление анальгетического действия, что послужило основой для изучения и анализа антиноцицептивной активности исследуемой кислоты. Более того, для соединений, проявляющих противовоспалительное и анальгетическое действие, указанный показатель является одним из важных критериев, позволяющих оценить природу обезболивающего эффекта последних.

При исследовании антиноцицептивной активности β -GA в тесте «*Tail-flick*» по латентному времени отдергивания хвоста было выявлено, что введенный внутривентриально препарат в дозе 100 мг/кг на 30-ой мин введения увеличивает порог болевой чувствительности на 8,9% по сравнению с исходной величиной, что превосходит тот же показатель контрольной группы животных на 33,9%. Дальнейший мониторинг латентного времени отдергивания хвоста показал, что, начиная с 60-ой минуты, отмечается постепенное ослабление эффекта препарата вплоть до 120 мин регистрации. При испытании β -GA в дозе 10 мг/кг отмеченные сдвиги особо не отличались от тех же данных, полученных в контрольной группе животных.

Полученные данные подтвердились и при оценке антиноцицептивной активности по расчету процента от максимально возможного эффекта (индекса латентности). При расчете индекса латентности после внутривентриального введения β -GA в дозе 100 мг/кг было установлено, что на 30, 60, 90 и 120 мин после введения β -GA рассчитанный показатель составлял 10,8%, 3,7%, (-) 39,9% и (-) 65,5% соответственно.

При сравнении антиноцицептивного действия β -GA с таковым известных препаратов с преимущественно периферическим (ASA) и центральным (парацетамол) компонентами

действия, оказалось, что если при введении ацетилсалициловой кислоты в дозе 10 мг/кг не регистрировались ощутимые изменения латентного времени отдергивания хвоста животных, в то время как при дозе 100 мг/кг отмечалось антиноцицептивное действие, которое, однако уступало таковому β -GA. При введении же парацетамола (300 мг/кг) были отмечены выраженные сдвиги указанных параметров, подтверждающие наличие центрального механизма анальгетической активности препарата.

По существу, проведенный фармакологический анализ механизма действия β -GA, указывает на наличие у β -GA не только периферического, но и центрального компонента антиноцицептивного действия. В пользу данного предположения свидетельствуют литературные данные о том, что в действительности, препараты с преимущественно периферическим механизмом антиноцицептивного действия практически не меняют латентного времени отдергивания хвоста в тесте «*Tail-flick*».

Полученные результаты относительно противовоспалительной и антиноцицептивной активности β -GA в совокупности с накопленными за последние годы многочисленными данными о ее антибактериальном, иммуномодулирующем, антиоксидантном действии, а также регенерирующей способности, послужили основанием для разработки 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты, как потенциального ранозаживляющего средства при различных раневых повреждениях, в частности при ожоговых повреждениях. Целесообразность подобного подхода в исследовании возможных проявлений указанной выше фармакологической активности 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты явились данные относительно принципиально нового подхода местного лечения ран и ожогов с применением веществ с антиоксидантным действием, каким является β -GA.

При изучении ранозаживляющего действия 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты в модели термического ожога с оценкой изменения площади раневых участков, была выявлена способность разработанной мази регенерировать тканевые повреждения, возможные механизмы которой были раскрыты при исследовании ее антибактериальной активности по отношению к микрофлоре отделяемого раны, определении изменений pH раневой поверхности и осуществлении цитологического анализа раневого экссудата в условиях термического ожога.

Так, при оценке площади поверхности ожоговой раны методом планиметрии было выявлено, что применение 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты (дважды в сутки по 0,2 г на поверхность), сопровождается более выраженным заживлением раневой поверхности по сравнению с аналогичными результатами группы животных, рана которых обрабатывалась только мазевой основой. Так, если в контрольной группе на 14-е сутки эксперимента регистрировалось сокращение площади раневой поверхности на 32,5%, то применение исследуемой мази способствовало уменьшению поверхности поражения на 49,1% по сравнению с исходной величиной.

При исследовании антибактериальной активности 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты было установлено, что в условиях применения указанной мази рост выявляемых в экссудатах ожоговых ран бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Coagulase-negative staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* и *Pseudomonas aeruginosa*, выражено подавляется, особенно на 14-е сутки эксперимента, в то время как в контрольной группе практически не наблюдались изменения микробного роста. Что касается грибковой флоры, то в ходе эксперимента не удалось получить данных, которые бы позволили судить о наличии антифунгальной активности β -ГА, так как в частности рост грибов типа *Aspergillus* практически не был отмечен в обеих группах животных.

Измерения pH раневой поверхности показали, что во все наблюдаемые сроки исследования (3-ьи, 7-е и 14-е сутки) применение 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты, сопровождается уменьшением значений pH по сравнению с контрольной группой. При анализе возможных механизмов, способствующих изменению pH раневой поверхности, привлекли внимание данные литературы, согласно которым [Taneja N. et al., 2013] поверхность ожоговой раны является хорошей средой для роста различных микроорганизмов, приводящих к повышению активности ряда ферментов, таких как уреазы, протеазы и др. Между тем, согласно данным как собственных исследований, приведённых выше, так и литературным источникам [McManus A.T. et al, 1982] раневая поверхность характеризуется повышенным ростом *Proteus mirabilis*, обладающего высокой уреазной активностью, и приводящего к накоплению аммиака и повышению pH. Повышенное значение pH замедляет репаративные процессы, подавляя грануляцию тканей и активность эндогенных биологически активных веществ таких, как факторы роста, цитокины и т.д, в

связи с чем и, в настоящее время, для восстановления ожоговой раны большое значение придается регуляция рН.

Проведенные нами эксперименты, по существу, полностью подтвердили все вышеперечисленное, поскольку на протяжении всего периода применения 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты в экспериментальной группе наряду со снижением роста *Proteus mirabilis* было выявлено также и уменьшение средних значений рН по сравнению с контрольной группой, что и, по всей вероятности, обосновывает благоприятное действие мази на регенерацию ожоговой раны.

Ранозаживляющая способность 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты была доказана также и изучением клеточного состава раневого содержимого. Подсчет соотношения нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов и фибробластов показал, что к концу эксперимента (на 14-е сутки исследования) в условиях применения исследуемой мази число лейкоцитов почти в два раза меньше ($13,4 \pm 1,95$) аналогичного показателя контрольной группы ($24,2 \pm 1,64$). Более того, на 14-е сутки применения мази определялись более высокие показатели для лимфоцитов ($7,4 \pm 1,34$) и макрофагов ($28,7 \pm 2,16$) по сравнению с таковыми контрольной группы ($2,0 \pm 1,00$ и $23,0 \pm 0,71$ соответственно). При анализе клеток фибробластического ряда обнаружилось, что содержание этих клеток на 14-й день эксперимента в экссудате в 1,4 раза превосходят их уровни в контрольной группе животных. Кроме того, при применении мази в раневом экссудате, наряду с фибробластами были выявлены и более дифференцированные клетки – фиброциты.

По существу, полученные данные относительно способности 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты ингибировать экссудативную фазу воспаления, стимулировать пролиферативную фазу раневого процесса, способствуя сокращению длительности воспалительного процесса и укорочению сроков заживления раны, вместе с представленными выше данными относительно способности препарата уменьшать инфицирование ожоговых ран и снижать рН раневой (ожоговой) поверхности, полностью обосновали возможное применение 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты в условиях термического ожога.

Таким образом, проведенные исследования полностью подтвердили правомочность поиска растительного источника с противовоспалительной, антиноцептивной и

ранозаживляющей активностью с содержанием β -ГА с целью создания новой лекарственной формы – 10%-ой мази β -ГА, для местного лечения патологий, сопровождающихся воспалением, болью и поражением тканей.

β -глицирретиновая кислота, обладая широким спектром фармакологической активности, входит в состав комбинированных лекарственных форм, которые доказали свою эффективность при лечении различных патологий полости рта. При этом доказательная база, подтверждающая способность β -ГА корректировать морфологические изменения, наблюдаемые при тех или иных нарушениях целостности слизистой ротовой полости, отсутствует. В связи с этим было исследовано влияние β -глицирретиновой кислоты на морфологические сдвиги в пульпе зубов на модели экспериментальной гиперестезии.

Результаты морфологических исследований показали, что патогистологические нарушения в пульпарных и околопульпарных тканях зубов крыс при аппликации β -ГА в условиях гиперестезии намного менее выражены в сравнении как с контрольной, так и группой животных с аппликацией растворителя (DMSO). Так, после применения препарата отмечалось сравнительное восстановление гистиоструктуры, о чем свидетельствовало выявление оформленных дентинных канальцев в дентине зубов и в дентиновой ткани лишь местами регистрируются мелкие очаги деструктивных процессов. Рыхлая волокнистая ткань в основном сохранена. Хорошо просматриваются преддентиновый и дентиновые слои и, хотя в центральной части пульпарной ткани отмечаются деструктивные процессы, они значительно менее выражены. Кроме того, после аппликации β -ГА расстройства крово- и лимфообращения, дистрофические и некротические процессы в пульпарной ткани незначительны. Все вышесказанное свидетельствует о протекторной способности β -ГА в условиях экспериментальной гиперестезии дентина.

Данные, доказывающие способность β -ГА устранять морфологические сдвиги в условиях экспериментальной гиперестезии зубов крыс, были подтверждены также и результатами клинического исследования с использованием препарата “Ангиноваг”, содержащего β -глицирретиновую кислоту.

Исследования, проведенные на 62 пациентах с учетом половых различий, возраста и нозологии показали, что стоматологический статус больных, получавших “Ангиноваг” имеет положительные сдвиги: длительность сроков заживления и эпителизации слизистой

оболочки полости рта больных по сравнению с группой больных, получавших общепринятую терапию намного укорачиваются (от 2-3 недель без применения препарата до 5-7 дней в условиях применения “Ангиноваг” при стоматитах, герпетических и грибковых поражениях, и патологиях пародонта). Полученные положительные клинические данные были подтверждены цитологическими исследованиями, свидетельствующими о том, что в реализации описанных эффектов задействована способность β -ГА воздействовать на клеточные структуры с абортацией митотической активности патогенных клеток в эпителиальных тканях. Полученные данные, по существу, могут явиться доказательной основой эффективности препарата “Ангиноваг” при различных патологиях слизистой оболочки полости рта и пародонта, что расширяет показания для его применения в клинике терапевтической стоматологии.

Таким образом, проведенный фармакологический анализ эффектов β -глицирретиновой кислоты и лекарственных форм с содержанием β -ГА в эксперименте и клинических наблюдениях открывают перспективы как для создания новых лекарств, так и расширения сферы применения существующих препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительный анализ противовоспалительной активности β -глицирретиновой кислоты (β -GA) с ацетилсалициловой кислотой (ASA) и диклофенаком натрия, осуществленный на модели индуцированного ксилолом острого воспаления и подтвержденный данными морфологического исследования, показал, что β -GA по своей активности уступает диклофенаку натрия, превосходя эффекты ASA.
2. Исследование антиноцицептивной активности β -GA в тесте «*Tail-flick*», позволило установить, что указанный эффект реализуется благодаря как периферическому, так и центральному компоненту действию препарата.
3. Выявлена способность 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты укорачивать сроки заживления ожоговых (термических) ран, стимулированием пролиферативной фазы раневого процесса, о чем свидетельствует уменьшение в раневом экссудате числа лейкоцитов и увеличение количества лимфоцитов, макрофагов и фиброцитов.
4. Установлено, что одним из важных механизмов в проявлении ранозаживляющего действия 10%-ой мази β -глицирретиновой кислоты является выявленная на экспериментальной модели ожоговой раны способность исследуемой лекарственной формы уменьшать рост микрофлоры раневого экссудата и снижать pH раневой поверхности.
5. Результаты исследований на модели экспериментальной гиперестезии дентина показали, что патогистологические нарушения в пульпарных и околопульпарных тканях зубов крыс при аппликации β -GA менее выражены, чем у животных контрольной группы.
6. Клиническое исследование препарата «Ангиноваг» содержащего β -GA с цитологическим подтверждением полученных данных доказало повышение эффективности лечения стоматитов, герпетических и грибковых поражений полости рта и патологий пародонта по сравнению с общепринятой терапией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азарова О.В. и Галактионова Л.П. Флавоноиды: механизм противовоспалительного действия. // Химия растительного сырья. - 2012. - N4. Стр. 61-78.
2. Брисякян Н.А., Гаспарян Г.В., Андриасян Л.Г., Арутюнян А.В., Хачатрян М.Дж. Морфофункциональное состояние пульпы зубов белых крыс под действием различных гипосенситивных средств в эксперименте. // Научно-практический журнал (спец. выпуск). Вестник стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Том 9, вып. 2-3. Стр. 43-50. - 2012.
3. Жамгарян А.Г. Получение лекарственных форм из семян Лоха узколистного и исследование их противовоспалительной и антиноцицептивной активности. // Диссертация на соиск. уч. степ. кандидата фарм. наук. -2008.
4. Журавлева М.В. Рациональное применение нестероидных противовоспалительных препаратов: баланс эффективности и безопасности. // «Вестник семейной медицины». – 2013. - № 1.
5. Котова О.В., Акарачкова Е.С. Боль в спине: эпидемиология, этиология, лечение. // Consilium Medicum. – 2017. - 2.3: 43-47 стр.
6. Меркулов Г.А. – Курс патологистологической техники. // “Медицина”, Ленинград, 1969.
7. Медведева Л.А., Загоруйко О.И., Гнездилов А.В., Никитина В.С. Хроническая боль: эпидемиология и социально-демографические характеристики пациентов клиники боли центра хирургии. // Клин. и эксперимент. хир. Журн. им. акад. Б.В. Петровского. - 2016. - № 3. С. 36–43.
8. Никитина В.С., Аюпова Р.Н., Яминева Э.З. Фенольные соединения высших растений и диагностика состояния окружающей среды. // Вестник Башкирского университета. - 2016. - Т.21. N2.
9. Поздеев О.К., Покровского В.И. // Медицинская микробиология: учебное пособие. - 2010 г. - 768 стр.

10. Рачин А.П., Шаров М.Н., Аверченкова А.А., Выговская С.Н., Нувахова М.Б. Хроническая боль: от патогенеза к инновационному лечению // РМЖ. - 2017. - №9. С. 625-631.
11. Рева И.В., Рева Г.В., Ямамото Т., Новиков А.С., Маломан Н.Ю. и соавт. Взаимодействие иммуноцитов в репаративной регенерации кожи // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 9-3. – С. 453-459.
12. Самбукова Т.В., Овчинников Б.В., Ганапольский В.П., и др. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. - 2017. - Т. 15. № 2. С. 56-63.
13. Семченко В.В., Барашкова С.А., Ноздрин В.Н., Артемьев В.Н. Учебное пособие. — 3-е изд., доп. и перераб. — Омск—Орел: Омская областная типография. // - 2006. - ISBN 5-87367-025-0.
14. Цурко В.В., Шавловская О.А. Фокина Н.М. НПВП – что изменилось за последние 10 лет? // РМЖ «Медицинское обозрение» №27. - 2014. - Стр. 1980.
15. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Аюшинова Н.И., Каня О.В. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани. // Сибирский медицинский журнал, N3. - 2012. - Стр 8-12.
16. Ярец Ю.И. Цитологические особенности локальных ран на различных этапах репаративного процесса. // «Медицина и здравоохранение». – 2009. - стр.41-43.
17. Abe N., Ebina T., Ishida N. Interferon induction by glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in mice. // Microbiol Immunol. - 1982. - 26 (6): 535-9.
18. Abima S.J.R., Renu A., Vijayaraghavan P. Insights of antidiabetic, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of antimicrobial secondary metabolites of corm extract from *Caladium x hortulanum*. // Saudi J Biol Sci. - 2018. - Dec; 25 (8): 1755-1761.
19. Ablise M., Leininger-Muller B., Wong C.D., Siest G., Loppinet V. et al. Synthesis and in vitro antioxidant activity of glycyrrhetic acid derivatives tested with the cytochrome P450/NADPH system. // Chem Pharm Bull (Tokyo). – 2004. - 52: 1436–9.
20. Agita A., Alsagaff M.T. Inflammation, Immunity, and Hypertension. // Acta Med Indones. - 2017. - Apr. 49 (2): 158-165.

21. Aguirre-Hernández E., Rosas-Acevedo H., Soto-Hernández M., Martínez A.L., Moreno J., González-Trujano M.E. Bioactivity-guided isolation of beta-sitosterol and some fatty acids as active compounds in the anxiolytic and sedative effects of *Tilia Americana* var. *mexicana*. // *Planta Med.* - 2007. - Sep. 73 (11): 1148-55.
22. Akasaka Y., Sakai A., Takasu K., Tsukahara M., Hatta A., Suzuki H., Inoue H. Suppressive Effects of Glycyrrhetic Acid Derivatives on Tachykinin Receptor Activation and Hyperalgesia. // *J Pharmacol Sci* 117, 180 – 188 (2011).
23. Alessandri A.L., Sousa L.P., Lucas C.D., Rossi A.G., Pinho V., Teixeira M.M. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. // *Pharmacol Ther.* - 2013. - Aug. 139 (2): 189-212.
24. Akasaka Y., Yoshida T., Tsukahara M., Hatta A., Inoue H. Glycyrrhetic acid prevents cutaneous scratching behavior in mice elicited by substance P or PAR-2 agonist. // *Eur J Pharmacol.* - 2011. - Nov. 16. 670 (1): 175-9.
25. Asl M.N., Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. // *Phytother. Res.* - 2008. - 22. 709–724.
26. Augustin J.M., Kuzina V., Andersen S.B., Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. // *Phytochemistry.* - 2011. - Apr. 72 (6): 435-57.
27. Baek S.J., Kim J.S., Jackson F.R., Eling T.E, McEntee M.F., Lee S.H. Epicatechin gallate-induced expression of NAG-1 is associated with growth inhibition and apoptosis in colon cancer cells. // *Carcinogenesis.* – 2004. - 25: 2425–2432.
28. Baek S.J., Wilson L.C., Eling T.E. Resveratrol enhances the expression of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) by increasing the expression of p53. // *Carcinogenesis.* - 2002. - 23: 425–434.
29. Bailey J.M. New mechanisms for effects of anti-inflammatory glucocorticoids. // *Biofactors.* - 1991. - Jun. 3 (2): 97-102.
30. Bengmark S. Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NFkappaB, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. // *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* - 2006. - Jan-Feb. 30 (1): 45-51.
31. Bergamini C.M., Gambetti S., Dondi A., Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. // *Curr Pharm Des.* - 2004. - 10 (14): 1611-26.

32. Bhavesh K. Lalan, Hiray R. S., Ghongane B. B. Evaluation of Analgesic and Anti-Inflammatory Activity of Extract of *Holoptelea Integrifolia* and *Argyrea Speciosa* in Animal Models. // *J Clin Diagn Res.* - 2015. - Jul. 9 (7): FF01–FF04.
33. Borbulevych O.Y., Jankun J., Selman S.H., Skrzypczak-Jankun E. Lipoxygenase interactions with natural flavonoid, quercetin, reveal a complex with protocatechuic acid in its X-ray structure at 2.1 Å resolution. // *Proteins.* - 2004. - Jan 1; 54 (1): 13-9.
34. Borgi W., Ghedira K., Chouchane N. Antiinflammatory and analgesic activities of *Zizyphus lotus* root barks. // *Fitoterapia.* - 2007. – Jan. 78 (1): 16-9.
35. Caplan A., Fett N., Rosenbach M., Werth V.P, Micheletti R.G. Prevention and management of glucocorticoid-induced side effects: A comprehensive review: Ocular, cardiovascular, muscular, and psychiatric side effects and issues unique to pediatric patients. // *J Am Acad Dermatol.* - 2017. - Feb. 76 (2): 201-207.
36. Camacho-Barquero L., Villegas I., Sánchez-Calvo J.M., Talero E., Sánchez-Fidalgo S et al. Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. // *Int Immunopharmacol.* - 2007. - Mar. 7 (3): 333-42.
37. Chandler R.F. "Licorice, more than just a flavour". // *Canadian Pharmaceutical Journal.* - 1985. - (118): 420–4.
38. Chang Y.L., Chen C.L., Kuo C.L., Chen B.C., You J.S.: Glycyrrhetic acid inhibits ICAM-1 expression via blocking JNK and NF-kappaB pathways in TNF-alpha-activated endothelial cells. // *Acta Pharmacol Sinica.* – 2010. - 31 (5): 546–553.
39. Chen F.F., Zhang Y.W., Huang X.F. Steroidal saponins and their pharmacological activities in *Solanum* plants. // *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* - 2016. - Mar. 41 (6):976-988.
40. Chen S., Liyi Zou L., Li Li, and Wu T. The Protective Effect of Glycyrrhetic Acid on Carbon Tetrachloride-Induced Chronic Liver Fibrosis in Mice via Upregulation of Nrf2. // *PLoS One.* - 2013. – 8 (1): e53662.
41. Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. // *Am. J. Clin. Nutr.* - 2005. - 81: 223S–229S.
42. Chen Y.C., Shen S.C., Lee W.R., Hou W.C., Yang L.L. et al. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2

- gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. // *J Cell Biochem.* - 2001. - 82 (4): 537-48.
43. Chi Y.S., Jong H.G., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S., Kim H.P. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. // *Biochem Pharmacol.* - 2001. - 62: 1185–1191.
 44. Chen Z., Cheng L., Feng G. Bone inflammation and chronic recurrent multifocal osteomyelitis. // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* - 2018. - 22: 1380-1386.
 45. Chomnawang M.T, Surassmo S., Nukoolkarn V.S., Gritsanapan W. Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by *Propionibacterium acnes*. // *Fitoterapia.* - 2007. - Sep; 78 (6):401-8.
 46. Chung Y.W, Tzu C.K., Wen H.L., Gow C.Y. Glycyrrhizic Acid and 18 β -Glycyrrhetic Acid Modulate Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Suppression of NF- κ B through PI3K p110 δ and p110 γ Inhibitions. // *J. Agric. Food Chem.* – 2011. - 59, 7726–7733.
 47. Classen-Houben D., Schuster D., Da Cunha T., Odermatt A., Wolber G., Jordis U., Kueenburg B. Selective inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 by 18 α -glycyrrhetic acid but not 18 β -glycyrrhetic acid. // *J Steroid Biochem Mol Biol.* – 2009. – 113 (3-5):248-52.
 48. Curreli F., Friedman-Kien A.E., Flore O. Glycyrrhizic acid alters Kaposi sarcoma-associated herpesvirus latency, triggering p53-mediated apoptosis in transformed B-lymphocytes. // *J Clin Invest.* - 2005. - Mar. 115 (3): 642-52.
 49. D'Amour F.E., Smith J.A. method for determining loss of pain sensation. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1941. -Vol.72. -P.74-79.
 50. Dai T., Huang Y.Y., Sharma S.K., Hashmi J.T., Kurup D.B., Hamblin M.R. Topical antimicrobials for burn wound infections. // *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* - 2010. - Jun; 5 (2): 124-51.
 51. Darshan S., Doreswamy R. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. // *Phytother Res.* - 2004. - May. 18 (5): 343-57.

52. Delporte C., Backhouse N., Erazo S., Negrete R., Vidal P. et al. Analgesic-antiinflammatory properties of *Proustia pyrifolia*. // *J Ethnopharmacol.* - 2005. - May 13. 99 (1): 119-24.
53. Di Paola R., Menegazzi M., Mazzon E., Genovese T., Crisafulli C. et al. Protective effects of glycyrrhizin in a gut hypoxia (ischemia)-reoxygenation (reperfusion) model. // *Intensive Care Med.* - 2009. - Apr. 35 (4): 687-97.
54. Doğan H.H, Aydın S. Determination of antimicrobial effect, antioxidant activity and phenolic contents of desert truffle in Turkey. // *Afr J Tradit Complement Altern Med.* – 2013. - May 16. 10 (4): 52-8.
55. Duffin R., Leitch A.E., Sheldrake T.A., Hallett J.M., Meyer C., et al. The CDK inhibitor, R-roscovitine, promotes eosinophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1. // *FEBS Lett.* - 2009. - 583, 2540–2546.
56. Dvorská M., Zemlicka M., Muselík J., Karafiátová J., Suchý V. Antioxidant activity of *Catalpa bignonioides*. // *Fitoterapia.* - 2007. - Sep. 78 (6): 437-9.
57. Działo M., Mierziak J., Korzun U., Preisner M., Szopa J., Kulma A. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. // *Int J Mol Sci.* - 2016. - Feb 18;17 (2): 160.
58. El Haouari M., López J.J., Mekhfi H., Rosado J.A., Salido G.M. Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. // *J Ethnopharmacol.* - 2007. - 113(2): 325-31.
59. Enioutina E.Y., Salis E.R., Job K.M., Gubarev M.I., Krepkova L.V, Sherwin C.M. Herbal Medicines: challenges in the modern world. Part 5. Status and current directions of complementary and alternative herbal medicine worldwide. // *Expert Rev Clin Pharmacol.* - 2017. - 10 (3): 327-338.
60. Feltensteina M.W., Schqhlyb W., Warnicka J.E., Fischerb N.H., Sufka K.J. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of sesquiterpene lactones from *Magnolia* and *Bear's foot*. // *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 79. - 2004. - 299 – 302.
61. Ferrari P. The role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. // *Biochim Biophys Acta.* - 2010. - Dec. 1802 (12): 1178-87.
62. Filosa R., Kasi P.D., Nabavi S.M. New trends in anti-inflammatory drugs. // *Eur J Med Chem.* - 2018. - Jun 10. 153:1.

63. Fiore C, Eisenhut M, Ragazzi E, et al. A history of the therapeutic use of liquorice in Europe. // *J Ethnopharmacol.* - 2005. - 99: 317-324.
64. Fiore C., Eisenhut M., Krausse R., Ragazzi E., Pellati D., Armanini D., Bielenberg J. Review Article. Antiviral Effects of Glycyrrhiza species. // *Phytotherapy Research* 22, 141–148 (2008).
65. Fiorucci S, Meli R, Bucci M, Cirino G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? // *Biochem Pharmacol.* - 2001. - 62: 1433–1438.
66. Focaccetti C., Izzi V., Benvenuto M., Fazi S., Ciuffa S. et al. Polyphenols as Immunomodulatory Compounds in the Tumor Microenvironment: Friends or Foes? // *Int J Mol Sci.* - 2019. - Apr 6. 20 (7).
67. Foong Ch.P., Hamid R.A. Evaluation of anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Annona muricata* leaves. // *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* - 2012. – Vol.22, N.6. –P. 1301-1307.
68. Ganesan K. and Xu B. A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. // *Nutrients.* - 2017. - May. 9 (5): 455.
69. Garbacki N., Tits M., Angenot L., Damas J. Inhibitory effects of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves on carrageenin acute inflammatory reactions induced in rats. // *BMC Pharmacol.* - 2004. - Oct 21: 4:25.
70. Garros I.C., Campos A.C.F., Tambara E.M., Tenorio S.B., Torres O.J.M. et al. Extract from *Passiflora edulis* on the healing of open wounds in rats: morphometric and histological study. // *Acta Cir. Bras.* - 2006. - Vol.21, Supl. 3. P. 55-65.
71. García-Sastre A., Biron C.A. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente. // *Science.* - 2006. - May 12. 312 (5775): 879-82.
72. Gilroy D.W., Lawrence T., Perretti M., Rossi A.G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. // *Nat Rev Drug Discov.* - 2004. - May. 3 (5): 401-16.
73. Gouveia M.G., Xavier M.A., Barreto A.S., Gelain D.P., Santos J.P. et al. Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract of *Combretum duarteanum* in rodents. // *J Med Food.* - 2011. - Nov. 14 (11): 1389-96.

74. Cragg G.M., Newman D.J., Snader K.M. Natural products in drug discovery and development. // *J Nat Prod.* - 1997. - Jan. 60 (1):52-60.
75. Guerin P.J., Olliaro P., Sundar S., Boelaert M., Croft S.L., et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. // *Lancet Infect* - (2002). - Dis 2: 494–501.
76. Gülçin I., Küfrevioğlu O.I., Oktay M., Büyükköroğlu M.E. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). // *J Ethnopharmacol.* – 2004. - 90 (2-3): 205-15.
77. Gumpricht E., Dahl R., Devereaux M.W., Sokol R.J. Licorice compounds glycyrrhizin and 18beta-glycyrrhetic acid are potent modulators of bile acid-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. // *J Biol Chem.* - 2005. - Mar. 18. 280 (11): 10556-63.
78. Gunter B.R., Butler K.A., Wallace R.L., Smith S.M., Harirforoosh S. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced cardiovascular adverse events: a meta-analysis. // *J Clin Pharm Ther.* - 2017. - Feb. 42 (1):27-38.
79. Gupta S., Chachra K.L., Bhadola P. and Sodhani P. Modified Papanicolaou staining protocol with minimum alcohol use: a cost-cutting measure for resource-limited settings. // *Cytopathology.* - 2009. - 21: 229–233.
80. Harborne J.B., Williams C.A. Advances in flavonoid research since 1992. // *Phytochemistry.* - 2000. - 55: 481–504.
81. Hardy M.E., Hendricks J.M., Paulson J.M., Faunce N.R. 18β-glycyrrhetic acid inhibits rotavirus replication in culture. // *Virology.* – 2012. - 9:96.
82. Harirforoosh S., Asghar W., Jamali F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. // *J Pharm Pharm Sci.* - 2013. - 16 (5): 821-47.
83. Hendricks J.M., Hoffman C., Pascual D.W., Hardy M.E. 18β-glycyrrhetic acid delivered orally induces isolated lymphoid follicle maturation at the intestinal mucosa and attenuates rotavirus shedding. // *PLoS One.* - 2012. - 7 (11): e49491.
84. Heneman K.M., Chang H.C., Prior R.L., Steinberg F.M. Soy protein with and without isoflavones fails to substantially increase postprandial antioxidant capacity. // *J Nutr Biochem.* – 2007. – 18 (1): 46-53.

85. Hibasami H., Iwase H., Yoshioka K., Takahashi H. Glycyrrhetic acid (a metabolic substance and aglycon of glycyrrhizin) induces apoptosis in human hepatoma, promyelotic leukemia and stomach cancer cells. // *Int J Mol Med.* – 2006. - 17 (2): 215-9.
86. Ho K.Y., Gwee K.A., Cheng Y.K., Yoon K.H. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in chronic pain: implications of new data for clinical practice. // *J Pain Res.* - 2018. - Sep 20. 11: 1937-1948.
87. Holgado D., Hopker J., Sanabria D., Zabala M. Analgesics and Sport Performance: Beyond the Pain-Modulating Effects. // *PM&R*, 10. -2018. - 72-82.
88. Hosseinzadeh H., Zarei H., Taghiabadi E. Antinociceptive, Anti-Inflammatory and Acute Toxicity Effects of *Juglans Regia* L. Leaves in Mice. // *Iran Red Crescent Med J.* - 2011. - Jan; 13 (1): 27–33.
89. Hou D.X., Fujii M., Terahara N., Yoshimoto M. Molecular Mechanisms Behind the Chemopreventive Effects of Anthocyanidins. // *J Biomed Biotechnol.* - 2004. - (5): 321-325.
90. Hu G., Lin H., Sottas C. M., Morris D. J., Hardy M. P. et al. Inhibition of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Enzymatic Activities by Glycyrrhetic Acid In Vivo Supports Direct Glucocorticoid-Mediated Suppression of Steroidogenesis in Leydig Cells. // *Journal of Andrology*, Vol.29, No. 3, May/June 2008.
91. Huang Y.P., Cao Y.F., Fang Z.Z., Zhang Y.Y., Hu C.M. et al. Glycyrrhetic acid exhibits strong inhibitory effects towards UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A3 and 2B7. // *Phytother Res.* – 2013. – 27 (9): 1358-61.
92. Hussain H., Green I.R., Shamraiz U., Saleem M., Badshah A. et al. Therapeutic potential of glycyrrhetic acids: a Patent review (2010-2017). // *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* (2018).
93. Huss U., Ringbom T., Perera P., Bohlin L., Vasänge M. Screening of ubiquitous plant constituents for COX-2 inhibition with a scintillation proximity based assay. // *J Nat Prod.* - 2002. - Nov. 65 (11): 1517-21.
94. Igbe I., Inarumen G.O. The effect of Leaf Aqueous Extract of *Brachystegia eurycoma* Harms (Fabacea) in Acute and Chronic Inflammatory Animal Models. // *British Journal of Pharmaceutical Research.* - 2013. – Vol.3, N.3 – P. 391-400.

95. Jeong H.G., Kim J.Y., Induction of inducible nitric oxide synthase expression by 18 β -glycyrrhetic acid in macrophages. // FEBS Lett. 513, 208 (2002).
96. Jeong H.G., You H.J., Park S.J. et al. Hepatoprotective effects of 18 β -glycyrrhetic acid on carbon tetrachloride-induced liver injury: inhibition of cytochrome P450 2E1 expression. // Pharm Res. - 2002. - 46: 221–227.
97. Jeong, J. B., Jeong, H. J. Rheosmin, a naturally occurring phenolic compound inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression in RAW264.7 cells by blocking NF-kB activation pathway. // Food Chem. Toxicol. - 2010. - 48, 2148–2153.
98. Jin L., Huang R., Huang X., Zhang B., Ji M. et al. Discovery of 18 β -glycyrrhetic acid conjugated aminobenzothiazole derivatives as Hsp90-Cdc37 interaction disruptors that inhibit cell migration and reverse drug resistance. // Bioorg Med Chem. - 2018. - May 1. 26 (8): 1759-1775.
99. Jing J., Ren W., Chen X., Wang Y., Yu Q. et al. Glucuronide-sulfate diconjugate as a novel metabolite of glycyrrhetic acid in rat bile. // Drug Metab Pharmacokinet. - 2008. - 23 (3): 175-80.
100. Johnson I.T. Phytochemicals and cancer. // Proc Nutr Soc. - 2007. - 66 (2): 207.
101. Jorge R.M., Leite J.P., Oliveira A.B., Tagliati C.A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. // J Ethnopharmacol. – 2004. – 94 (1): 93-100.
102. Jutooru I., Chadalapaka G., Chintharlapalli S., Papineni S. Safe Induction of Apoptosis and Nonsteroidal Antiinflammatory Drug-Activated Gene 1 in Pancreatic Cancer Cells By A Glycyrrhetic Acid Derivative. // Mol Carcinog. - 2009. - August. 48 (8): 692–702.
103. Kalaiarasi P., Pugalendi K.V. Antihyperglycemic effect of 18 beta-glycyrrhetic acid, aglycone of glycyrrhizin, on streptozotocin-diabetic rats. // Eur J Pharmacol. - 2009. - Mar 15; 606 (1-3): 269-73.
104. Kandulski A, Venerito M, Malfertheiner P. Non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) - balancing gastrointestinal complications and the cardiovascular risk. // Deutsche Medizinische Wochenschrift. - 2009. - 134: 1635–40.

105. Kang O.H, Kim J.A., Choi Y.A., Park H.J., Kim D.K. et al. Inhibition of interleukin-8 production in the human colonic epithelial cell line HT-29 by 18 beta-glycyrrhetic acid. // *Int J Mol Med.* - 2005. – 15 (6): 981-5.
106. Kang S.U., Shin Y.S., Hwang H.S., Baek S.J., Lee S.H. et al. Tolfenamic acid induces apoptosis and growth inhibition in head and neck cancer: involvement of NAG-1 expression. // *PLoS One.* - 2012. - 7 (4): e34988.
107. Kao T.C., Shyu M.H., Yen G.C. Neuroprotective Effects of Glycyrrhizic Acid and 18 β -Glycyrrhetic Acid in PC12 Cells via Modulation of the PI3K/Akt Pathway. // *J. Agric. Food Chem.* - 2009. - 57, 754–76.
108. Kao T.C., Shyu M.H., Yen G.C. Glycyrrhizic acid and 18beta-glycyrrhetic acid inhibit inflammation via PI3K/Akt/GSK3beta signaling and glucocorticoid receptor activation. // *J Agric Food Chem.* - 2010. - Aug 11. 58 (15): 8623-9.
109. Kao T.C., Wu C.H., Yen G.C. Glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid recover glucocorticoid resistance via PI3K-induced AP1, CRE and NFAT activation. // *Phytomedicine.* - 2013. - Feb 15. 20 (3-4): 295-302.
110. Kaul D., Sikand K., Shukla A.R. Effect of green tea polyphenols on the genes with atherosclerotic potential. // *Phytother Res.* - 2004. - Feb. 18 (2): 177-9.
111. Keil G.J., Delander G.E. Time-dependent antinociceptive interactions between opioids and nucleotide transport inhibitors. // *J. Pharmacol Exp Ther.* - 1995. – Vol.274. – P. 1387-1392.
112. Kiekow C.J., Figueiro F., Dietrich F., Vechia L.D., Pires E.N. et al. Quercetin derivative induces cell death in glioma cells by modulating NF-kappaB nuclear translocation and caspase-3 activation. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 84. - 2016. - P. 116–122.
113. Kim D.H., Hong S.H., Kim B.T., Bae E.A., Park H.Y. and Han M. J., Biotransformation of glycyrrhizin by human intestinal bacteria and its relation to biological activities. // *Arch. Pharm. Res.*, 23, 172-177 (2000).
114. Kim H.P., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. // *J Pharmacol Sci.* – 2004. – 96 (3): 229-45.
115. Kim S.H., Hong J.H., Lee J.E., Lee Y.C. 18 β -Glycyrrhetic acid, the major bioactive component of *Glycyrrhizae Radix*, attenuates airway inflammation by modulating Th2

- cytokines, GATA-3, STAT6, and Foxp3 transcription factors in an asthmatic mouse model. // *Environ Toxicol Pharmacol.* - 2017. - Jun. 52: 99-113.
116. Kim S.R., Jeon H.J., Park H.J., Kim M.K., Choi W.S. et al. Glycyrrhetic acid inhibits *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced vascular permeability via the suppression of interleukin-8. // *Inflammation Research.* - 2012. - Feb. 62 (2): 145-54.
117. Klaunig J.E., Babich M.A., Baetcke K.P., Cook J.C., Corton J.C, David R.M., et al. PPARalpha agonist-induced rodent tumors: modes of action and human relevance. // *Crit Rev Toxicol.* - 2003. - 33. 655–780.
118. Kroes B.H., Beukelman C.J., Van Den Berg A.J.J., Wolbink G.J., Van Dijk H. et al. Inhibition of human complement by beta-glycyrrhetic acid. // *Immunology.* - 1997. - 90: 115–120.
119. Koenders N., Rushton A., Heneghan N., Verra M.L., Willems P., Hoogeboom T., Staal J.B. Pain and disability following first-time lumbar fusion surgery for degenerative disorders: a systematic review protocol. // *Systematic Reviews.* - 2016. - 5:72.
120. Krähenbühl S., Hasler F., Frey B.M., Frey F.J., Brenneisen R. et al. Kinetics and dynamics of orally administered 18 beta-glycyrrhetic acid in humans. // *J Clin Endocrinol Metab.* - 1994. - Mar. 78 (3): 581-5.
121. Krafta K., Langhorst J. *Phytotherapy – New Developments and Insights into Practice.* // *Forsch Komplementmed.* Rostock, Germany. - 2014. - 21: 345–346.
122. Kratschmar D.V., Vuorinen A., Da Cunha T., Wolber G., Classen-Houben D. et al. Characterization of activity and binding mode of glycyrrhetic acid derivatives inhibiting 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. // *J Steroid Biochem Mol Biol.* - 2011. - May. 125 (1-2): 129-42.
123. Kroes B.H., Beukelman C.J., Berg van den A. J., Wolbink G. J., Dijk van H. and Labadie R. P. Inhibition of human complement by beta-glycyrrhetic acid. // *Immunology.* - 1997. - January. 90 (1): 115–120.
124. Kuang P., Zhao W., Su W., Zhang Z., Zhang L. et al. 18b-Glycyrrhetic acid inhibits hepatocellular carcinoma development by reversing hepatic stellate cell-mediated immunosuppression in mice. // *International Journal of Cancer:* p.1-11 (2012).

125. Kurzbaum E., Iliasafov L., Kolik L., Starosvetsky J., Bilanovic D. et al. From the Titanic and other shipwrecks to biofilm prevention: The interesting role of polyphenol-protein complexes in biofilm inhibition. // *Sci Total Environ.* - 2019. - Mar 25. 658: 1098-1105.
126. Lanas A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase inhibition in the gastrointestinal tract: A trip from peptic ulcer to colon cancer. // *Am J Med Sci.* - 2009. - 338: 96–106.
127. Latha B., Babu M. Review The involvement of free radicals in burn injury. // *Burns* 27 - 2001. - P. 309–317.
128. Lättig J., Böhl M., Fischer P., Tischer S., Tietböhl C. et al. Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A2 by flavonoids: rationale for lead design. // *J Comput Aided Mol Des.* - 2007. - Aug. 21 (8): 473-83.
129. Lawrence T. The Nuclear Factor NF-κB Pathway in Inflammation. // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* - 2009. - Dec. 1(6): a001651.
130. Lee C.S., Kim Y.J., Lee M.S., Han E.S., Lee S.J. 18beta-Glycyrrhetic acid induces apoptotic cell death in SiHa cells and exhibits a synergistic effect against antibiotic anti-cancer drug toxicity. // *Life Sci.* - 2008. - Sep 26. 83 (13-14): 481-9.
131. Li J., Liu Y.P. The roles of PPARs in human diseases. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* - 2018. - 37(7): 361-382.
132. Li H.E., Qiu J.Z., Yang Z.Q., Dong J., Wang J.F. et al. Glycyrrhetic acid protects mice from *Staphylococcus aureus* pneumonia. // *Fitoterapia.* - 2012. - Jan; 83 (1): 241-8.
133. Li H.Y., Xu W., Su J., Zhang X., Hu L.W. et al. In vitro and in vivo inhibitory effects of glycyrrhetic acid on cytochrome P450 3A activity. // *Pharmacology.* - 2010. - 86 (5-6): 287-92.
134. Li S., Qiu Y.Q., Zhang S.H., Gao Y.H. A novel transdermal fomulation of 18β-glycyrrhetic acid with lysine for improving bioavailability and efficacy. // *Skin Pharmacol Physiol.* - 2012. - 25 (5): 257-68.
135. Lin G., Nnane I.P., Cheng T.V. et al., "The effects of pretreatment with glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on the retrorsine-induced hepatotoxicity in rats". // *TOXICON*, 37(9), - 1999. - pp. 1259-1270.

136. Liu S.J., Tang Z.S., Liao Z.X., Cui C.L., Liu H.B. et al. The chemistry and pharmacology of *Ligularia przewalskii*: A review. // *J. Ethnopharmacol.* - 2018. - Jun 12. 219: 32-49.
137. Long D.R., Mead J., Hendricks J.M., Hardy M.E., Voyich J.M. 18 β -Glycyrrhetic acid inhibits methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* survival and attenuates virulence gene expression. // *Antimicrob Agents Chemother.* - 2013. - Jan. 57 (1): 241-7.
138. Luo H., Huang W., Zhang Z., Wu Q., Huang M. et al. 18 β -glycyrrhetic acid-induced apoptosis and relation with intracellular Ca²⁺ release in human breast carcinoma cells. // *Chi. Ger. J. Clin. Oncol.* - 2004. - 3: 137–140.
139. Malhotra S., Tavakkoli M., Edraki N., Miri R., Sharma S.K. et al. Neuroprotective and Antioxidant Activities of 4-Methylcoumarins: Development of Structure-Activity Relationships. // *Biol Pharm Bull.* - 2016. - 39 (9): 1544-8.
140. Marsella R., Cornegliani L., Ozmen I., Bohannon M., Ahrens K. et al. Randomized, double-blinded, placebo-controlled pilot study on the effects of topical blackcurrant emulsion enriched in essential fatty acids, ceramides and 18-beta glycyrrhetic acid on clinical signs and skin barrier function in dogs with atopic dermatitis. // *Vet Dermatol.* - 2017. - Dec. 28 (6): 577-e140.
141. Marsico F., Paolillo S., Filardi P.P. NSAIDs and cardiovascular risk. // *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* - 2017. - Jan: 18. Suppl 1: Special Issue on The State of the Art for the Practicing Cardiologist: The 2016 Conoscere E Curare Il Cuore (CCC) Proceedings from the CLI Foundation: e40-e43.
142. Ma Y., Li Y., Li X., Wu Y. Anti-inflammatory Effects of 4-Methylcyclopentadecanone on Edema Models in Mice. // *International Journal of Molecular Sciences.* - 2013. – Vol.14. –P. 23980-23992.
143. Maatooq G.T., Marzouk A.M., Gray A.I., Rosazza J.P. Bioactive microbial metabolites from glycyrrhetic acid. // *Phytochemistry.* – 2010. - 71 (2-3): 262-70.
144. Mandegary A., Sayyah M., Heidari M.R. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of the seed and root extracts of *ferula gummosa boiss* in mice and rats. // *Daru.* – 2004. – Vol.12, -N.2. –P. 58-62.

145. Martín R., Hernández M., Córdova C., M.L. Natural triterpenes modulate immune-inflammatory markers of experimental autoimmune encephalomyelitis: therapeutic implications for multiple sclerosis. // *Br J Pharmacol.* - 2012. - 166 (5): 1708–1723.
146. Mashima R. and Okuyama T. The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. // *Redox Biol.* - 2015. - Dec. 6: 297–310.
147. Mayrovitz H.N., Soontupe L.B. Wound Areas by Computerized Planimetry of Digital Images: Accuracy and Reliability. // *Avances in Skin & Wound Care.* – 2009. – Vol.22, N.5. –P. 222-229.
148. McManus A.T., McLeod C.G.Jr., Mason A.D.Jr. Experimental *Proteus mirabilis* burn surface infection. // *Arch Surg.* - 1982. - 117 (2): 187-91.
149. Michaelis M., Geiler J., Naczki P., Sithisarn P., Leutz A., Doerr H.W., Cinatl J. Jr. Glycyrrhizin exerts antioxidative effects in H5N1 influenza A virus-infected cells and inhibits virus replication and pro-inflammatory gene expression. // *PLoS One.* - 2011. - 6 (5): e19705.
150. Miliauskas G., Venskutonis P.R. and van Beek T.A. “Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts”. // *Food Chemistry,* - 2004. - v.85, p. 231-237.
151. Mo S.J., Son E.W., Lee S.R., Lee S.M., Shin D.H., Pyo S. CML-1 inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and adhesion molecule expression in endothelial cells through inhibition of I κ B α kinase. // *J Ethnopharmacol.* - 2007. - 109 (1): 78-86.
152. Moon M.H., Jeong J.K., Lee Y.J., Seol J.W., Ahn D.C. et al. 18 β -Glycyrrhetic acid inhibits adipogenic differentiation and stimulates lipolysis. // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2012. - Apr 20. 420 (4): 805-10.
153. Mozos I., Malainer C., Horbańczuk J., Gug C., Stoian D. et al. Inflammatory Markers for Arterial Stiffness in Cardiovascular Diseases. // *Front Immunol.* - 2017. -Aug 31. 8: 1058.
154. Nakajima A., Yamakuni T., Matsuzaki K., Nakata N., Onozuka H. et al. Nobiletin, a citrus flavonoid, reverses learning impairment associated with N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by activation of extracellular signal-regulated kinase signaling. // *J Pharmacol Exp Ther.* - 2007. - May. 321 (2): 784-90.

155. Nergard C.S., Diallo D., Inngjerdigen K., Michaelsen T.E., Matsumoto T. et al. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali Anti-ulcer-, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. // *J Ethnopharmacol.* - 2005. - Jan 4. 96 (1-2): 255-69.
156. Odongo G.A., Schlotz N., Herz C., Hanschen F.S., Baldermann S. et al. The role of plant processing for the cancer preventive potential of Ethiopian kale (*Brassica carinata*). // *Food Nutr. Res.* - 2017. - 61: 1271527.
157. Okoli C.O., Akah P.A., Nwafor S.V., Anisiobi A.I., Ibegbunam I.N. et al. Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* C.D. Adams. // *J Ethnopharmacol.* - 2007. - Jan 19. 109 (2):219-25.
158. Olas B., Wachowicz B., Stochmal A., Oleszek W. Anti-platelet effects of different phenolic compounds from *Yucca schidigera* Roezl bark. // *Platelets.* - 2002. - May. 13 (3): 167-73.
159. Ooi L.S, Wang H., Luk C.W., Ooi V.E. Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). // *J Ethnopharmacol.* - 2004. - Sep. 94 (1): 117-22.
160. Orhan I., Küpeli E., Terzioğlu S., Yesilada E. Bioassay-guided isolation of kaempferol-3-O-beta-D-galactoside with anti-inflammatory and antinociceptive activity from the aerial part of *Calluna vulgaris* L. // *J Ethnopharmacol.* - 2007. - Oct 8. 114 (1): 32-7.
161. Owoyele V.B., Oloriegbe Y.Y., Balogun E.A., Soladoye A.O. Analgesic and anti-inflammatory properties of *Nelsonia canescens* leaf extract. // *J Ethnopharmacol.* - 2005. - May 13. 99 (1): 153-6.
162. Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. Flavonoids: an overview. // *J Nutr Sci.* - 2016. - Dec 29. 5: e47.
163. Park C., Moon D.O., Rhu C.H., Choi B.T., Lee W.H. et al. Beta-sitosterol induces anti-proliferation and apoptosis in human leukemic U937 cells through activation of caspase-3 and induction of Bax/Bcl-2 ratio. // *Biol Pharm Bull.* - 2007. - Jul. 30 (7): 1317-23.
164. Park H.Y., Park S.H., Yoon H.K., Han M.J., Kim D.H. Anti-allergic activity of 18beta-glycyrrhetic acid-3-O-beta-D-glucuronide. // *Arch Pharm Res.* - 2004. - 27 (1): 57-60.
165. Parihar A., Parihar M.S., Milner S., Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. // *Burns.* - 2008. - 34 (1): 6-17.

166. Pathania S., Ramakrishnan S.M., Randhawa V. and Bagler G. Serpentina DB: a database of plant-derived molecules of Rauvolfia serpentine. // *BMC Complementary and Alternative Medicine* - 2015. - 15: 262.
167. Pellati D., Fiore C., Armanini D., Rassu M., Bertoloni G. In vitro effects of glycyrrhetic acid on the growth of clinical isolates of *Candida albicans*. // *Phytother Res.* - 2009. - 23: 572–574.
168. Peng L.N., Li L., Qiu Y.F., Miao J.H., Gao X.Q. et al. Glycyrrhetic acid extracted from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. induces the expression of Toll-like receptor 4 in Ana-1 murine macrophages. // *J Asian Nat Prod Res.* - 2011. - Oct. 13 (10): 942-50.
169. Perretti M. The resolution of inflammation: New mechanisms in patho-physiology open opportunities for pharmacology. // *Semin Immunol.* - 2015. - 27 (3): 145-8.
170. Pistelli L., Bertoli A., Lepori E., Morelli I., Panizzi L. Antimicrobial and antifungal activity of crude extracts and isolated saponins from *Astragalus verrucosus*. // *Fitoterapia.* - 2002. - Jul. 73 (4): 336-9.
171. Ploeger B., Mensinga T., Sips A., Seinen W., Meulenbelt J. et al.. The pharmacokinetics of glycyrrhizic acid evaluated by physiologically based pharmacokinetic modeling. // *Drug Metab Rev.* - 2001. - May. 33 (2): 125-47.
172. Poulsen L.L.C., Siersbaek M., Mandrup S. PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. // *Semin. Cell Dev. Biol.* - 2012. - 23, 631–639.
173. Poprac P., Jomova K., Simunkova M., Kollar V., Rhodes C.J. et al. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. // *Trends Pharmacol Sci.* - 2017. - 38 (7): 592-607.
174. Prata J., Santos S.G., Almeida M.I., Coelho R., Barbosa M.A. Bridging Autism Spectrum Disorders and Schizophrenia through inflammation and biomarkers - pre-clinical and clinical investigations. // *J Neuroinflammation.* - 2017. - Sep 4. 14 (1): 179.
175. Punchard N.A., Whelan C.J., Adcock I. The Journal of Inflammation. // *J. Inflamm (Lond).* - 2004. - 1: 1.
176. Ragone M.I., Sella M., Conforti P., Volonté M.G., Consolini A.E. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum. // *J Ethnopharmacol.* - 2007. - Sep 5. 113 (2): 258-66.

177. Rajaratnam M., Prystupa A., Lachowska-Kotowska P., Załuska W., Filip R. Herbal medicine for treatment and prevention of liver diseases. // *J. PreClin Clin Res.* - 2014. - 8 (2): 55–60.
178. Rattanachaikunsopon P., Phumkhachorn P. Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens. // *Fitoterapia.* - 2007. - Sep. 78 (6): 434-6.
179. Rawlingson A. Nitric oxide, inflammation and acute burn injury. // *Burns.* - 2003. - Nov. 29 (7): 631-40.
180. Rosillo M.A., Alarcón-de-la-Lastra C., Sánchez-Hidalgo M. An update on dietary phenolic compounds in the prevention and management of rheumatoid arthritis. // *Food Funct.* - 2016. - Jul 13. 7 (7): 2943-69.
181. Rossiter S.E., Fletcher M.H, Wuest W.M. Natural Products as Platforms To Overcome Antibiotic Resistance. // *Chem Rev.* – 2017. – 117 (19): 12415-12474.
182. Ruggieri V., Vitale G., Filaferro M., Frigeri C., Pini L.A. et al. The antinociceptive effect of acetylsalicylic acid is differently affected by a CB1 agonist or antagonist and involves the serotonergic system in rats. // *Life Sci.* - 2010. - Mar 27. 86 (13-14): 510-7.
183. Ruggiero P., Tombola F., Rossi G., Pancotto L., Lauretti L., Del Giudice G., Zoratti M. Polyphenols reduce gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection or VacA toxin administration in mice. // *Antimicrob Agents Chemother.* - 2006. - Jul. 50 (7): 2550-2.
184. Salari M.H., Kadkhoda Z. In vitro antibacterial effects of glycyrrhetic acid on periodontopathogenic and capnophilic bacteria isolated from adult periodontitis. // *Clin Microbiol Infect.* - 2003. - Sep. 9 (9): 987-8.
185. Sampson L., Rimm E., Hollman P.C., de Vries J.H., Katan M.B. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc.* - 2002. - 102: 1414–1420.
186. Sannomiya M., Fonseca V.B., da Silva M.A., Rocha L.R., Dos Santos L.C. et al. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. // *J Ethnopharmacol.* - 2005. – 97 (1): 1-6.
187. Santino A., Scarano A., De Santis S., De Benedictis M., Giovinazzo G. et al. Gut Microbiota Modulation and Anti-Inflammatory Properties of Dietary Polyphenols in IBD: New and Consolidated Perspectives. // *Curr Pharm Des.* - 2017. - 23 (16): 2344-2351.

188. Santos M.D., Almeida M.C., Lopes N.P., de Souza G.E. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. // *Biol Pharm Bull.* - 2006. – 29 (11): 2236-40.
189. Satomi Y., Nishino H., Shibata S. Glycyrrhetic acid and related compounds induce G1 arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2. // *Anticancer R.* - 2005. - 25: 4043–7.
190. Sasaki H., Suzuki N. Alshwaimi E., Xu Y., Battaglino R. et al. 18 β -glycyrrhetic acid inhibits periodontitis via glucocorticoid-independent nuclear factor- κ B inactivation in interleukin-10-deficient mice. // *J Periodontal Res.* - 2010. - Dec. 45 (6): 757-63.
191. Sayyah M., Hadidi N., Kamalinejad M. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats. // *J Ethnopharmacol.* - 2004. - Jun. 92 (2-3): 325-9.
192. Schmid-Schonbein G.W. Analysis of inflammation. // *Annu Rev Biomed Eng.* - 2006. - 8: 93-131.
193. Schröfelbauer B., Raffetseder J., Hauner M., Wolkerstorfer A., Ernst W., Szolar O.H. Glycyrrhizin, the main active compound in liquorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signalling. // *Biochem J.* - 2009. - Jul 15. 421 (3): 473-82.
194. Schwarz S., Csuk R. Synthesis and antitumour activity of glycyrrhetic acid derivatives. // *Bioorg Med Chem.* - 2010. - Nov 1.18 (21): 7458-74.
195. Simon J.P., Prince S.E. Natural remedies for non-steroidal anti-inflammatory drug-induced toxicity. // *J Appl Toxicol.* - 2017. – 37 (1): 71-83.
196. Six D.A., Dennis E.A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. // *Biochim Biophys Acta.* - 2000. - 1488: 1–19.
197. Shah S.M.M., Sadiq A., Shah S.M.H., Ullah F. Antioxidant, total phenolic contents and antinociceptive potential of *Teucrium stocksianum* methanolic extract in different animal models. // *BMC Complement Altern Med.* - 2014. - 14: 181.
198. Sharma G., Kar S. Palit S., Das P.K. 18 β -glycyrrhetic acid induces apoptosis through modulation of Akt/FOXO3a/Bim pathway in human breast cancer MCF-7 cells. // *J Cell Physiol.* - 2012. - May. 227 (5): 1923-31.

199. Shetty R., Sreekar H., Lamba S., Gupta A.K. A novel and accurate technique of photographic wound measurement. // *Indian J Plast Surg.* - 2012. - 45 (2): 425–429.
200. Shin Y.W., Bae E.A., Lee B., Lee S.H., Kim J.A. et al. In vitro and in vivo antiallergic effects of *Glycyrrhiza glabra* and its components. // *Planta Med.* – 2007. – 73 (3): 257-61.
201. Shu J., Li L., Zhou M., Yu J., Peng C. Three new flavonoid glycosides from *Smilax glabra* and their anti-inflammatory activity. // *Nat Prod Res.* - 2018. - Aug. 32 (15): 1760-1768.
202. Spagnuolo C., Moccia S., Russo G.L. Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. // *Eur J Med Chem.* - 2018. - Jun 10. 153: 105-115.
203. Vanuum S.H.M., Walker B.R, Ad. Hermus R. M. M., Sweep C. G. J., Smits. P. et al. Effect of glycyrrhetic acid on 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in normotensive and hypertensive subjects. // *Clinical Science.* - 2012. - 102, 203-211.
204. Stout A., Friedly J., Christopher J.S. Systemic Absorption and Side Effects of Locally Injected Glucocorticoids. // *PM R. Narrative Review.* March. - (2019). - 1-11.
205. Su L., Wang Z., Huang F., Lan R., Chen X. 18 β -Glycyrrhetic acid mitigates radiation-induced skin damage via NADPH oxidase/ROS/p38MAPK and NF- κ B pathways. // *Environ Toxicol Pharmacol.* - 2018. - Jun. 60: 82-90.
206. Taherian A.A., Babaei M., Vafaei A.A., Jarrahi M., Jadidi M., Sadeghi H. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract of *thymus vulgaris*. // *Pakistan journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2009. –Vol. 22, N.1. –P. 83-89.
207. Taneja N., Chari P., Singh M., Singh G., Biswal M. et al. Evolution of bacterial flora in burn wounds: key role of environmental disinfection in control of infection. // *Int J Burns Trauma.* - 2013. - Apr. 18. 3 (2): 102-7.
208. Tsao L.T., Tsai P.S., Lin R.H., Huang, L.J., Kuo, S.C. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by phenolic (3E)-4-(2-hydroxyphenyl) but-3-en-2-one in RAW 264.7 macrophages. // *Biochem. Pharmacol.* - 2005. - 70, 618–626.
209. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. // *Nutrients.* - 2010. - Dec. 2 (12): 1231-46.
210. Tsao R. and McCallum J. Chemistry of Flavonoids. // *Chemistry, Nutritional Value and Stability.* Chapter 5 Blackwell Publishing; Ames, IA, USA. - 2009. - pp. 131–153.

211. Tsukahara M., Nishino T., Furuhashi I., Inoue H., Sato T. et al. Synthesis and inhibitory effect of novel glycyrrhetic acid derivatives on IL-1 β -induced prostaglandin E2 production in normal human dermal fibroblasts. // *Chem Pharm Bull.* - 2005. - 53: 1103–1110.
212. Tsukamoto S., Aburatani M., Yoshida T., Yamashita Y., El-Beih A.A. et al. CYP3A4 inhibitors isolated from Licorice. // *Biol Pharm Bull.* - 2005. – 28 (10): 2000-2.
213. Ukil A., Biswas A., Das T., Das P.K. 18 Beta-glycyrrhetic acid triggers curative Th1 response and nitric oxide up-regulation in experimental visceral leishmaniasis associated with the activation of NF-kappa. // *B. J Immunol.* - 2005. - 175: 1161–1169.
214. Ukil A., Kar S., Srivastav S., Ghosh K., Das P.K. Curative Effect of 18 β -Glycyrrhetic Acid in Experimental Visceral Leishmaniasis Depends on Phosphatase-Dependent Modulation of Cellular MAP Kinases. // *PLoS ONE.* Volume 6. Issue 12 (2011).
215. Varga Z., Sabzwari S.R.A., Vargova V. Cardiovascular Risk of Nonsteroidal AntiInflammatory Drugs: An Under-Recognized Public Health Issue. // *Cureus.* - 2017. – 9 (4): e1144.
216. Vostinaru O. Adverse Effects and Drug Interactions of the Non- Steroidal Anti- Inflammatory Drugs. // *IntechOpen.* - 2017. - Chapter 3, 17-31p.
217. Wang L.J., Geng C.A., Ma Y.B., Huang X.Y., Luo J. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships of glycyrrhetic acid derivatives as novel anti-hepatitis B virus agents. // *Bioorg Med Chem Lett.* - 2012. - May 15. 22 (10): 3473-9.
218. Wheeler D.S., Catravas J.D., Odoms K., Denenberg A., Malhotra V. et al. Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 beta-dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells. // *J Nutr.* - 2004. - May. 134 (5): 1039-44.
219. Wongrakpanich S., Wongrakpanich A., Melhado K., Rangaswami J. A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. // *Aging and Disease.* - 2018. – 9 (1): 143–150.
220. Wu X., Zhang L., Gurley E., Studer E., Shang J. et al. Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity by 18 β -glycyrrhetic acid through lysosomal and mitochondrial pathways. // *Hepatology.* - 2008. - 47. 1905–1915.

221. Xiao J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? // *Crit Rev Food Sci Nutr.* - 2017. - Jun 13. 57 (9): 1874-1905.
222. Xiao Y., Xu J., Mao C., Jin M., Wu Q. et al. 18β-glycyrrhetic acid ameliorates acute Propionibacterium acnes-induced liver injury through inhibition of macrophage inflammatory protein-1α. // *J Biol Chem.* – 2010. – 285(2): 1128-37.
223. Xiao X., Shi D., Liu L., Wang J., Xie X. et al. Quercetin suppresses cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis through inactivation of P300 signaling. // *PLoS One.* - 2011. - 6 (8): e22934.
224. Yahfoufi N., Alsadi N., Jambi M., Matar C. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. // *Nutrients.* - 2018. - Nov 2. 10 (11).
225. Yamaguchi H., Yu T., Kidachi Y., Akitaya T., Yoshida K. et al. Selective toxicity of glycyrrhetic acid against tumorigenic r/m HM-SFME-1 cells is potentially attributed to downregulation of glutathione. // *Biochimie.* - 2011. – 93 (7): 1172-8.
226. Yang J.C., Myung S.C., Kim W., Lee C.S. 18β-glycyrrhetic acid potentiates Hsp90 inhibition-induced apoptosis in human epithelial ovarian carcinoma cells via activation of death receptor and mitochondrial pathway. // *Mol Cell Biochem.* - 2012. - Nov. 370 (1-2): 209-19.
227. Yang Y., Lee G.J., Yoon D.H., Yu T., Oh J., Jeong D., Lee J., Kim S.H., Kim T.W., Cho J.Y. ERK1- and TBK1-targeted anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Dryopteris crassirhizoma*. // *Journal of Ethnopharmacology.* – 2013. – Vol.145. – P. 499-508.
228. Yook H.S., Kim K.H., Park J.E., Shin H.J. Antioxidative and antiviral properties of flowering cherry fruits (*Prunus serrulata* L. var. *spontanea*). // *Am J Chin Med.* - 2010. - 38 (5): 937-48.
229. Yoon J.H., Baek S.J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. // *Yonsei Med J.* – 2005. – 46 (5): 585-96.
230. Yoshida T., Abe K., Ikeda T., Matsushita T., Wake K. et al. Inhibitory effect of glycyrrhizin on lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced mouse liver injury. // *Eur. J. Pharmacol.* - 2007. - 576, 136–142.

231. Yoshizawa K., Cioca D.P., Kawa S., Tanaka E., Kiyosawa K. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand troglitazone induces cell cycle arrest and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell lines. // *Cancer*. - 2002. - 95: 2243–2251.
232. Zhang M.Z., Xu J., Yao B., Yin H., Cai Q. et al. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II selectively blocks the tumor COX-2 pathway and suppresses colon carcinogenesis in mice and humans. // *J Clin Invest*. - 2009. - Apr. 119 (4): 876-85.
233. Zhang X., Zhang S., Yang Y., Wang D., Gao H. Natural barrigenol-like triterpenoids: A comprehensive review of their contributions to medicinal chemistry. // *Phytochemistry*. - 2019. - May. 161: 41-74.
234. Zhao K., Ding M., Cao H., Cao Z.X. In-vitro metabolism of glycyrrhetic acid by human and rat liver microsomes and its interactions with six CYP substrates. // *J Pharm Pharmacol*. - 2012. – 64(10): 1445-51.
235. Zhao X., Liu J., Hu Y., Fan Y., Wang D. et al. Optimization on condition of glycyrrhetic acid liposome by RSM and the research of its immunological activity. // *Int J Biol Macromol*. - 2012. - 51 (3): 299-304.
236. Zhou X., Zhao L., Liu X., Li X, Jia F. et al. Antimycobacterial and Synergistic Effects of 18β- Glycyrrhetic Acid or Glycyrrhetic acid- 30- piperazine in Combination with Isoniazid, Rifampicin or Streptomycin against *Mycobacterium bovis*. // *Phytotherapy Research* 26: 253–258 (2012).
237. Zuco V., Supino R., Righetti S.C., Cleris L., Marchesi E. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. // *Cancer Lett*. - 2002.-Jan 10.175(1):17-25.