

На правах рукописи

ЕФИМОВ СЕРГЕЙ НИКОЛАЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА КАК
ОСНОВЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ АНТИМУТАГЕННОГО ФИТОСРЕДСТВА**

15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук**

Томск – 2004 г.

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель	Заслуженный работник высшей школы РФ, доктор фармацевтических наук, профессор Дмитрук Степан Евгеньевич
Официальные оппоненты	доктор фармацевтических наук, профессор Ханина Мениса Абдуллаевна кандидат фармацевтических наук, доцент Дудко Владимир Владимирович
Ведущая организация	ГОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «24» декабря 2004 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.04 при Сибирском государственном медицинском университете по адресу: 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 107

Автореферат разослан «19» ноября 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор химических наук,
профессор



М.С. Юсубов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одной из важнейших задач современной медицины является профилактика и коррекция последствий загрязнения окружающей среды для человека. Эта проблема, помимо возрастания естественного фона радиации, находится в тесной связи с постоянным поступлением в окружающую среду отходов промышленных производств и применяемых в сельском хозяйстве химикатов. Указанная задача относится к числу важных также в связи с расширением арсенала химических соединений в промышленности, быту, медицине и научных исследованиях.

С особой остротой данная проблема возникает в моменты аварий на химических производствах и атомных электростанциях, когда окружающая среда и человеческое сообщество испытывает на себе действие сильнейшего мутагенного пресса.

Следует отметить, что выраженным мутагенным действием на организм человека обладают и некоторые широко используемые в медицинской практике препараты и вакцины (диоксидин, винкристин, циклофосфамид, тетрациклин, нирдазол, пипемидиевая кислота, паротитная и туляремийная вакцины, вакцинный штамм вируса кори и др.) [Белоголовская Е.Г. и соавт., 2000; Кулакова А.В., и соавт., 1999; Moore F.R. и соавт., 1995; Ильинских Н.Н. и соавт., 1984, 1991].

Все упомянутые и другие факторы риска влияют на генетический аппарат, который отвечает за точность воспроизводства свойств и признаков в поколениях, а также за выполнение роли регулятора всех протекающих в организме процессов. Как следствие действия мутагенов в настоящее время отмечается эскалация мутаций, врожденных уродств, злокачественных новообразований [Дурнев А.Д., и соавт. 1993., 2000; Худoley В.В., 1992].

Поскольку исключить контакт человека с мутагенными факторами практически невозможно, важное значение приобретает поиск природных антимутагенов, способных предотвратить генотоксичное действие внешнесредовых факторов. С данной точки зрения интерес представляют лекарственные растения, использование которых значительно возросло в последние годы. И это не случайно, так как для биологически активных веществ, содержащихся в растениях, характерны низкая токсичность и аллергогенность, комплексное воздействие на организм, возможность длительного применения без побочных эффектов [Адекенов С.М., и соавт. 2004; Бариляк И.Р., и соавт. 1994; Салихова Р.А., и соавт. 1993].

Отдельные примеры влияния растительных биологически активных комплексов на мутационный процесс демонстрируют перспективы подобного рода исследований.

Поэтому поиск корректоров мутагенных эффектов незаменимых ксенобиотиков из растений в качестве профилактических средств защиты

генетических структур человека, является актуальной задачей. В пользу актуальности указанной проблемы также свидетельствует крайне малая степень изученности представителей флоры Сибири на антимуtagenную активность.

Цель диссертационной работы состоит в оценке антимуtagenной активности различных представителей флоры Сибири и создании научно-обоснованной прописи лекарственного растительного сбора, обладающего антимуtagenным действием.

Для реализации поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Провести скрининговые исследования перспективных источников антимуtagenных веществ среди некоторых представителей флоры Сибири;
2. Научно обосновать компонентный состав антимуtagenного сбора;
3. Провести фармакогностическое исследование сбора и разработать методики его идентификации и стандартизации;
4. Предложить рациональную технологию жидкого экстракта из антимуtagenного сбора и провести его стандартизацию;
5. Изучить специфическое действие жидкого экстракта;
6. Разработать проект фармакопейной статьи предприятия (ФСП) на лекарственный растительный сбор.

Научная новизна работы. На основании собственных исследований и анализа литературных источников впервые разработана пропись лекарственного растительного сбора, обладающего антимуtagenным действием.

Установлен качественный и количественный состав основных биологически активных веществ сбора (полисахариды, фенольные соединения в т.ч. флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты и кумарины, аскорбиновая кислота, витамин К, каротиноиды, хлорофилл) и полученного из него водно-спиртового экстракта.

Предложены показатели определения доброкачественности сбора, включенные в проект ФСП.

Для идентификации сбора предложены внешние и микроскопические диагностические признаки входящих в него ингредиентов.

Определены и включены в нормативную документацию методики качественного обнаружения и количественного определения основных биологически активных веществ (БАВ) сбора (полисахаридов и флавоноидов).

Обоснован рациональный метод получения жидкого экстракта из сбора и проведена его стандартизация по общепринятым показателям, содержанию флавоноидов и полисахаридов, установлено его антимуtagenное и антиоксидантное действие, доказана безвредность.

Практическая значимость работы. Теоретические и экспериментальные исследования показали целесообразность использования предложенного сбора и жидкого экстракта из него в качестве антимуtagenного средства. Разработан проект ФСП на лекарственный растительный сбор антимуtagenного действия. Предложена рациональная технология получения жидкого экстракта из сбора.

На защиту выносятся результаты теоретического и экспериментального обоснования разработки лекарственного растительного сбора и экстракционного препарата на его основе, обладающего антимуtagenным действием.

Апробация материалов диссертации. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на 62-ой международной конференции студентов и молодых ученых (г.Томск, 2003 г.); постоянно действующей научно-технической школе-семинаре студентов, аспирантов и молодых специалистов «Информационные системы мониторинга окружающей среды» (г.Томск, 2003-2004 гг.); IV конгрессе молодых ученых «Науки о человеке» (г. Томск, 2003 г.); V конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (г. Томск, 2004 г.); научном семинаре института фитохимии министерства образования и науки Республики Казахстан (г. Караганда, 2004 г.); IV межрегиональной научно-практической конференции «Фармация XXI века» (г. Новосибирск, 2004 г.); 59-ой региональной научной конференции по фармации и фармакологии «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (г. Пятигорск, 2004 г.); научной конференции «Лекарственные растения в фармакологии и фармации» (г. Барнаул, 2004г.), пятой межрегиональной научно-практической конференции «Молодежь в XXI веке» (г. Барнаул, 2004г), а также на научных семинарах кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии СибГМУ (г.Томск, 2001-2004 гг.).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии Сибирского государственного медицинского университета и комплексной целевой программой СО АМН Российской Федерации «Фармакогностическое изучение перспективных источников биологически активных веществ Сибири» (№ Государственной регистрации 01.2.00 101709).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, получена приоритетная справка по заявке на изобретение (№2004116287 от 28.05.2004 г).

Экспериментальные исследования по теме диссертации выполнялись на кафедре фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, кафедре биологии и генетики, кафедре фармацевтической технологии СибГМУ, а также в лаборатории химии фенольных и стероидных соединений

Института фитохимии МОН Республики Казахстан. Сотрудникам данных подразделений приносим глубокую благодарность.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, четырех глав экспериментальных исследований, выводов, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 32 таблицами и 27 рисунками. Библиографический указатель включает 182 источника литературы, из них 30 зарубежных.

Во введении обоснована актуальность проблемы, сформулирована цель и задачи исследования, охарактеризованы научная новизна и практическая значимость работы.

В обзоре литературы (глава 1) приведен анализ проблемы мутагенеза, охарактеризованы антимутагенные средства синтетического и природного происхождения. Обозначена перспектива получения антимутагенных средств на основе лекарственного растительного сырья флоры Сибири.

Вторая глава посвящена описанию объектов и методов исследования.

В третьей главе приведены результаты скринингового исследования перспективных источников антимутагенных веществ среди некоторых представителей флоры Сибири.

В четвертой главе дается обоснование компонентного состава антимутагенного сбора, результаты исследования химического состава и методик определения подлинности и доброкачественности сбора.

В пятой главе изложены результаты разработки рациональной технологии получения жидкого экстракта сбора, предложены методики его стандартизации. Приведены результаты исследования антимутагенной и антиоксидантной активности экстракционного препарата из сбора.

В приложении представлен проект ФСП «Сбор антимутагенный».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методики исследования

Подбор компонентов сбора осуществлялся, на основании результатов скрининга водных экстрактов растений на антимутагенную активность, при этом обращалось внимание на природу БАВ и многоуровневый патогенез мутаций.

В состав антимутагенного сбора отобрано 5 видов лекарственного растительного сырья: Flores Calendulae, Radices Taraxaci, Folia Urticae, Herba Eguiseti, Semini Lini, собранного в регионах Сибири в течение лета 2001-2003 гг., а также использованы отдельные образцы промышленных партий сырья.

Качественный состав и количественное содержание БАВ, содержащихся в сборе, изучался с использованием таких современных методов фитохимического анализа как спектрофотометрия, хроматография (бумажная, тонкослойная хроматография, ВЭЖХ) и др. Количественное содержание БАВ

определялось в пересчете на абсолютно сухое сырье. Для идентификации сырья использовались макро- и микроскопические методы.

Экспериментальные исследования антимуtagenной активности компонентов и сбора в целом, а также лекарственных форм на его основе проводились на кафедре биологии и генетики СибГМУ под руководством Заслуженного работника высшей школы РФ, доктора биологических наук, профессора Ильинских Н.Н., за что выражаем ему искреннюю признательность. В экспериментах было использовано 446 мышей, полученных из питомника «Рассвет» НПО «Вирион» г. Томска.

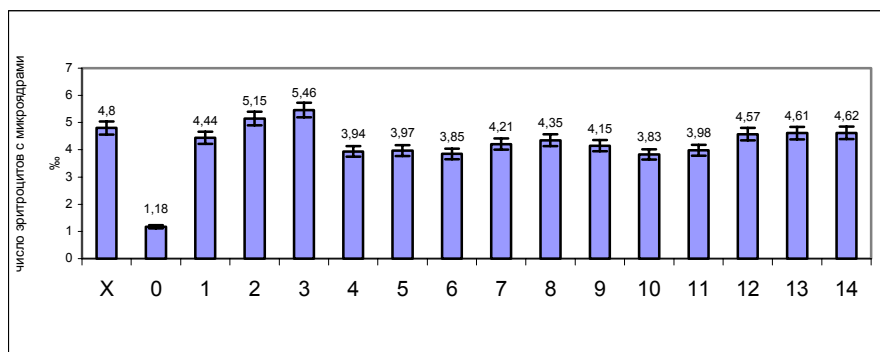
Технологические исследования сбора и жидких экстрактов из него проводились с использованием фармакопейных методик.

Для проведения статистической обработки фактического материала использовался статистический пакет Statistica 6.0. Фактические данные представлены в виде «среднее \pm ошибка среднего» ($M \pm m$), кроме того, при микроядерном анализе рассчитывались доверительные интервалы для средних значений числа микроядер. Проверку на нормальность распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро-Вилка. Так как все изучаемые показатели подчинялись нормальному закону распределения, применялся параметрический t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05.

Скрининг растений на антимуtagenную активность

Для проведения направленного поиска растений с антимуtagenной активностью методом микроядерного анализа были изучены суммарные комплексы (водные экстракты) полученные из сырья 41 вида растений флоры Сибири. Отбор объектов для скрининга проводился с учетом сведений о составе БАВ растений и практики их применения в народной медицине в качестве противораковых средств. Кроме того, при выборе объектов исследования учитывался ресурсный фактор.

Как видно из результатов представленных на рисунках 1,2,3 экстракты проявили разные уровни антимуtagenной активности. По данному признаку их можно условно разделить на три группы. К первой группе (рис. 1) отнесены экстракты с низким уровнем активности, которые снижали число микроядер в эритроцитах облученных мышей до 3,83% ($p < 0,05$), либо даже несколько увеличили их количество. В числе указанных источников сырья (обозначенные соответствующими цифрами на рис. 1) боярышник кроваво-красный (1), серпуха венценосная (2), хвощ луговой (3), хвощ зимующий (4), чистотел большой (5), чага (6), лабазник шестилепестный (7), можжевельник обыкновенный (8), зверобой продырявленный (9), калина обыкновенная (10), рябина черноплодная (11), шиповник майский (12), клюква болотная (13), хвощ болотный (14).



Примечание: X – число эритроцитов с микродрамами у облученных мышей, 0 – интактные животные

Рисунок 1 – Число эритроцитов с микродрамами (%) у облученных мышей на фоне введения экстрактов растений (группа экстрактов растений со слабым антимуагенным эффектом)

Экстракты второй группы (рис. 2), проявили более высокую активность, и снизили количество микроядер в эритроцитах в пределах до 2,95 % ($p < 0,05$), что дает предпосылки для их дальнейшего изучения.

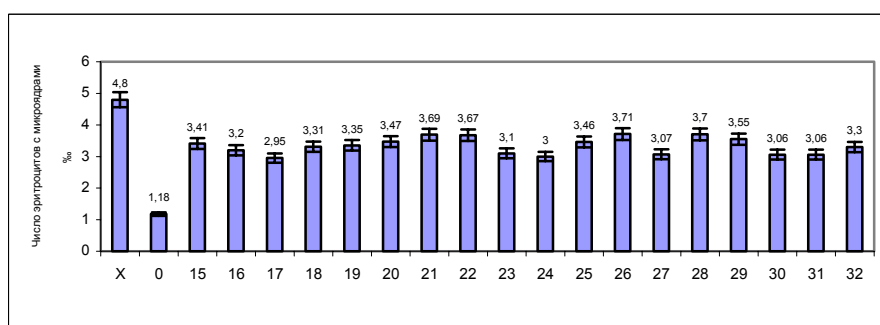


Рисунок 2 – Число эритроцитов с микродрамами (%) у облученных мышей на фоне введения экстрактов растений (группа экстрактов растений со средним антимуагенным эффектом)

Такую активность проявили суммарные комплексы, полученные из сырья следующих видов, обозначенные соответствующими цифрами на рисунке 2: аир болотный (15), багульник болотный (16), донник лекарственный (17), лихнис халцедонский (18), лопух войлочный (19), мята перечная (20), облепиха крушиновидная (21), пижма обыкновенная (22), подорожник большой (23), полынь горькая (24), рябина обыкновенная (25), ряска малая (26), сушеница топяная (27), тмин обыкновенный (28), тысячелистник обыкновенный (29), хвощ полевой (30), черника обыкновенная (31), чеснок посевной (32).

Как видно из рис. 3, наиболее выраженные антимуtagenные свойства были установлены для экстрактов таких известных растений как: валериана лекарственная (33), календула лекарственная (34), крапива двудомная (35), лён посевной (36), лук репчатый (37), одуванчик лекарственный (38), подорожник ландцетный (39), подорожник средний (40), хвощ лесной (41).

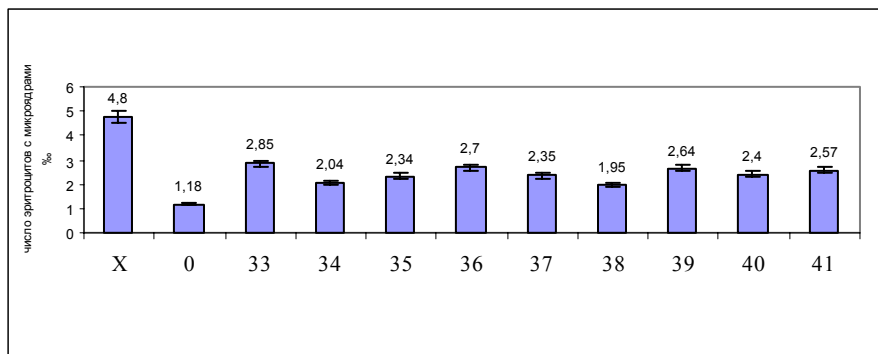


Рисунок 3 – Число эритроцитов с микроядрами (%) у облученных мышей на фоне введения экстрактов растений (группа экстрактов растений с высоким антимуtagenным эффектом)

Высокая эффективность биологически активных комплексов растений данной группы послужила в дальнейшем основанием для составления на их основе сбора. При подборе его компонентов учитывалась также способность БАВ растений влиять на основные звенья мутационного процесса

Разработка компонентного состава антимуtagenного сбора

На основании скринингового исследования водных экстрактов на предмет антимуtagenной активности, а также изучения литературных данных, был разработан растительный сбор. В его состав включены следующие виды лекарственного растительного сырья: корни одуванчика, цветки ноготков, листья крапивы, трава хвоща полевого и семена льна. Подбор компонентов сбора осуществлялся с учетом способности их БАВ влиять на основные звенья мутационного процесса. Так, например:

- *корни одуванчика лекарственного* выбраны из-за способности его БАВ (полисахаридов, горечей, флавоноидов) оказывать целенаправленное действие на мутагенез, а также исходя из практики применения данного растения в народной медицине при раковых опухолях различной локализации.

- *цветки ноготков лекарственных* в состав сбора были выбраны по результатам скрининга, а также как концентраты весьма важных групп БАВ-антимуtagenов, и прежде всего каротиноидов, которые являются основными действующими веществами растения (до 3%).

- *выбор листьев крапивы двудомной* связан, главным образом, с содержанием в них витаминов (аскорбиновой кислоты, каротиноидов и витамина К), хлорофилла и солей железа, которые нормализуют в организме человека липидный обмен, оказывают стимулирующее действие на эритропоэз, а также снижают повреждающее действие мутагенов различных классов. Содержащийся в листьях крапивы в высоких количествах хлорофилл, обладает выраженной способностью блокировать активацию промутагенов ферментами микросом, действовать как дисмутаген. Хлорофилл также способен нейтрализовывать свободные радикалы.

- *трава хвоща полевого* включена в состав сбора по результатам скрининга, а его высокий антимуtagenный эффект обеспечивают тритерпеновые сапонины и флавоноиды. Согласно сведениям литературных источников тритерпеновые сапонины интенсивно угнетают метаболизм проканцерогенов. Что же касается флавоноидов, то они проявляют себя как антиоксиданты, синергичные с аскорбиновой кислотой. Они способны связывать тяжелые металлы, угнетать перекисное окисление липидов, блокировать связывание активных форм мутагенов с ДНК и угнетать свободнорадикальные реакции.

- *семена льна посевного* в состав сбора включены по результатам скрининга, а также исходя из сведений литературы, свидетельствующих о возможном дисмутагенном действии БАВ семян льна. Немаловажная роль в фармакологическом действии семян льна принадлежит витаминам А (β -каротин) и Е (токоферол), вносящим вклад в их антимуtagenное действие.

Таким образом, результаты скрининга на антимуtagenную активность перечисленных выше водных экстрактов и данные литературы позволили нам обосновать целесообразность их использования в составе антимуtagenного сбора. К этому следует добавить и то, что все 5 компонентов предлагаемого сбора относятся к числу официального лекарственного растительного сырья, применение которого разрешено на территории России.

В связи с тем, что кроме формирования обоснованного компонентного состава лекарственного растительного сбора требуется также разработка рационального количественного соотношения его компонентов, то на следующем этапе исследований было составлено шесть вариантов прописи сбора, которые отличались количественным соотношением каждого из пяти компонентов по отношению друг к другу. Описание количественного соотношения компонентов в вариантах сбора представлено в таблице 1.

Таблица 1. – Количественное соотношение компонентов в вариантах антимуутагенного сбора

Лекарственное растительное сырье	Массовых частей сырья					
	вар. №1	вар. №2	вар. №3	вар. №4	вар. №5	вар. №6
Цветки ноготков	5	1	2	3	4	1
Корни одуванчика	4	5	1	2	3	1
Листья крапивы	3	4	5	1	2	1
Трава хвоща полевого	2	3	4	5	1	1
Семена льна	1	2	3	4	5	1

Для каждого из 6 указанных вариантов сбора, методом микроядерного анализа, определялась антимуутагенная активность. Результаты испытаний представлены в таблице 2, из которой видно, что наиболее активным можно считать вариант № 6 водный экстракт которого в дозе 50 мг/кг, уменьшил в первый день после облучения количество микроядер до 1,82‰ ($p < 0,05$). На третьи и пятые сутки снижение числа микроядер, под его влиянием составляло до 1,80 и 1,92‰ ($p < 0,05$) соответственно. Близкий уровень антимуутагенной активности был установлен для варианта №1 в дозе 100 мг/кг, действие которого более выражено на ранних сроках эксперимента.

Остальные виды экстрактов из вариантов сбора (№2,3,4,5) показали в эксперименте различные уровни активности, выраженные в способности снижать число микроядер в эритроцитах в пределах до 2,50‰ (в контроле 4,96).

Таким образом, на основании полученных нами данных, можно утверждать, что экстракт шестого варианта сбора (табл. 1) обладает более активными антимуутагенными свойствами, что выражается в его способности снижать частоту индуцированных ионизирующим излучением микроядер в периферической крови мышей. Нетрудно заметить, что в указанном сборе все 5 компонентов присутствуют в равных количествах.

Таблица 2. – Влияние экстрактов из вариантов сбора на число эритроцитов с микроядрами в крови мышей ($M \pm m$, средние из 5 определений)

Экспериментальные группы	Доза (мг/кг)	Число эритроцитов с микроядрами, ‰		
		1 сутки	3 сутки	5 сутки
Экстракт из варианта №1+облучение	25	2,56±0,7*	2,62±0,5**	2,4±0,3*
	50	2,44±0,1*	2,46±0,2*	2,6±0,5**
	100	2,4±0,1*	2,6±0,3*	2,0±0,2*
Экстракт из варианта №2+облучение	25	2,78±0,1*	2,86±0,5*	2,98±0,4*
	50	2,52±0,2*	3,0±0,2*	3,4±0,1*
	100	3,26±0,1*	2,5±0,5*	2,8±0,2*
Экстракт из варианта №3+облучение	25	3,76±0,8*	3,52±0,6**	2,82±0,4*
	50	3,4±0,2*	2,9±0,5*	2,8±0,3*
	100	3,5±0,1*	3,4±0,3*	2,8±0,5*
Экстракт из варианта №4+облучение	25	3,04±0,7*	3,24±0,3*	2,84±0,6*
	50	2,74±0,3*	3,0±0,1*	2,5±0,2*
	100	3,4±0,3*	3,2±0,3*	2,9±0,3*
Экстракт из варианта №5+облучение	25	2,66±0,9*	3,28±0,8*	3,12±0,1*
	50	2,54±0,2*	2,8±0,2*	2,6±0,4*
	100	2,5±0,5*	2,5±0,2*	2,4±0,1*
Экстракт из варианта №6+облучение	25	2,04±0,3*	2,36±0,4*	2,28±0,8*
	50	1,82±0,4*	1,8±0,1*	1,92±0,2*
	100	2,2±0,2*	2,5±0,3*	2,2±0,1*
Интактные животные	-	1,22±0,2*	1,42±0,3*	1,4±0,3*
Облученные животные (контроль)	-	4,96±0,6	4,3±0,5	4,0±0,5

Примечание: * - отмечены значения достоверно отличающиеся от контроля (* - при $p < 0,05$, ** - при $p < 0,01$)

Однако в задачи нашего исследования входило разработка не только состава сбора, но и методов его стандартизации. Последнее включало исследование качественного и количественного содержания основных групп БАВ сбора и выбор главных действующих веществ, по которым будет проводится его стандартизация.

Исследование химического состава антимуутагенного сбора

По данным литературы наиболее значимыми БАВ компонентов сбора являются полисахариды, витамины, растительные пигменты, фенольные соединения, сапонины, макро и микроэлементы. Поэтому названные классы БАВ определялись нами в антимуутагенном сборе, как в качественном, так и в количественном отношении.

Фенольные соединения исследовали методом двумерной хроматографии в системе растворителей: 15% раствор кислоты уксусной; н-бутанол-кислота уксусная-вода (4:1:2); в результате установили, что антимуутагенный сбор

содержит 10 веществ фенольной природы, которые представлены агликонами и гликозидами флавоноидов, фенолкарбоновыми кислотами, кумаринами.

Для более детального изучения химического состава фенольного комплекса экстрактов из сбора нами был использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для этих целей проводили экстракцию измельченного сырья сбора 20 и 70% этанолом. Исследование проводили на хроматографе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series. Детектирование велось при длине волны 255 нм; при анализе использовались достоверные образцы фенолкарбоновых кислот, флавоноидов и кумаринов.

В результате установили (рис. 4,5), что экстракты из сбора содержат 20 компонентов, два из которых нами отнесены к фенолкарбоновым кислотам (кофейная и галловая кислоты), 1 вещество было нами идентифицировано как рутин.

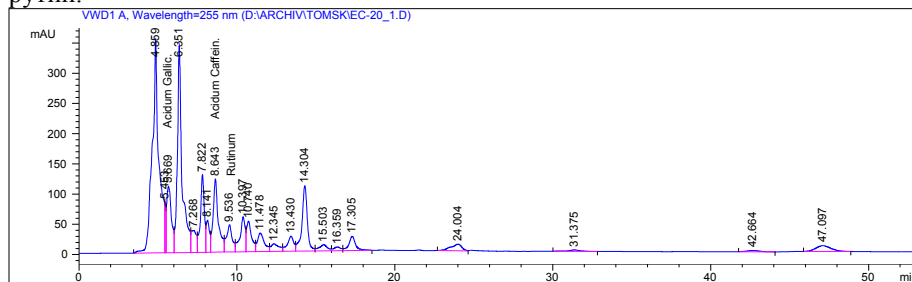


Рисунок 4 – Хроматограмма 20% этанольного экстракта сбора

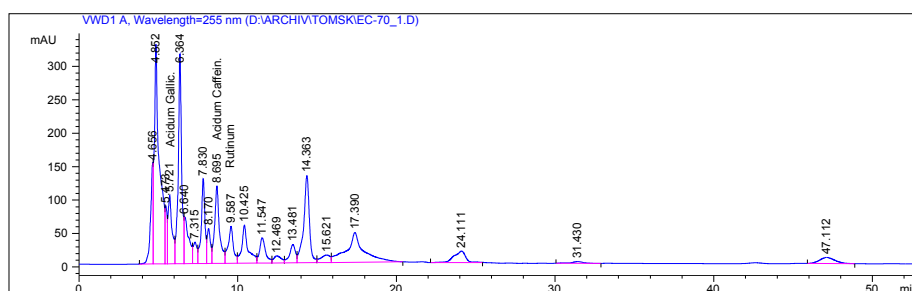


Рисунок 5 – Хроматограмма 70% этанольного экстракта сбора

Присутствие остальных групп БАВ (кумаринов, дубильных веществ, полисахаридов, сапонинов, витаминов, алифатических кислот и алкалоидов) было установлено с помощью общепринятых реакций.

Количественное определение БАВ показало (табл. 3), что антимуtagenный сбор содержит в наибольших количествах полисахариды (16,48%) и флавоноиды (1,36%), которые по данным литературы, наряду с

другими БАВ, могут быть ответственными и за антимуtagenное действие сбора.

Таблица 3. – Количественное содержание основных групп БАВ в сборе (M±m, средние из 5 определений)

Группа БАВ	Содержание, (%)
Сумма полисахаридов	16,48±0,46
Сумма фенольных соединений	2,22±0,15
Флавоноиды	1,36±0,06
Фенолкарбоновые кислоты	0,75±0,02
Кумарины	0,05±0,00
Аскорбиновая кислота (мг%)	46,00±2,00
Каротиноиды (мг%)	121,11±1,50
Витамин К	0,15±0,01
Хлорофилл (мг%)	13,00±0,5

Кроме перечисленных групп БАВ, обнаруженных в составе сбора, был исследован его элементный состав. Определение химических элементов проводилось методом нейтронно-активационного анализа, а мотивацией для этого были данные литературы, свидетельствующие, что такие элементы как кальций, цинк, кобальт, и селен могут прямо или косвенно принимать участие в антимуtagenном действии. В результате наших исследований было установлено, что в компонентах антимуtagenного сбора, а точнее в самом сборе содержится 28 химических элементов (табл. 4).

Таблица 4. – Содержание химических элементов в сборе, %

Элемент	Содержание, %	Элемент	Содержание, %	Элемент	Содержание, %
Ca	0,89	Zn*	6,3	Co*	0,22
Na	0,053	Br*	13,12	Sm*	0,026
Fe	0,032	Ba*	17,69	Lu*	0,0022
Cr*	1,54	Se*	0,30	U *	0,11
Yb*	0,011	As*	0,44	Th*	0,028
Au*	0,0044	La*	0,016	Hf*	0,04
Sr*	54,19	Cs*	0,074	Tb*	0,0066
Ag*	1,49	Sc*	0,087	Rb*	23,22
Eu*	0,0066	Sb*	0,051	Ta*	0,015
Hg*	0,17				

Примечание: * - содержание элемента %*10⁻⁴

Из них в сравнении с другими растениями в количественном отношении выделяются такие жизненно важные элементы, как кальций, цинк, кобальт, железо и селен.

Учитывая необходимость в разработке методик для стандартизации антимуtagenного сбора, а также приведенную выше информацию о значительном содержании в нем полисахаридов и флавоноидов, данные группы БАВ предложены нами для оценки качества сбора. В связи с этим, нами были предложены методики качественного обнаружения и количественного определения флавоноидов и полисахаридов.

Разработка методик стандартизации антимуtagenного сбора

Для определения подлинности сбора за основу была взята методика обнаружения флавоноидов по хроматографическому поведению в тонком слое сорбента на пластинках «Сорбфил» в сравнении с достоверным образцом рутина.

Количественное содержание суммы флавоноидов в сборе предлагается определять спектрофотометрическим методом с использованием ГСО рутин и комплексообразующей реакции с алюминия хлоридом. При разработке методики анализа определялось влияние степени измельчения сырья, условий экстракции, природы и концентрации экстрагента на выход флавоноидов. Установлено, что максимальное количество флавоноидов извлекается из сырья, измельченного до 1 мм. Нашими исследованиями установлено, что экстрагирование флавоноидов целесообразнее проводить 70% этанолом при соотношении сырья и экстрагента 1:50 на кипящей водяной бане так как дальнейшее увеличение соотношения сырье:экстрагент не приводит к повышению выхода флавоноидов. В связи с тем, что флавоноиды в данном сырье содержатся как в виде агликонов, так и гликозидов, с целью гидролиза гликозидов флавоноиды извлекали 70% этанолом, подкисленным хлористоводородной кислотой. Проведенные эксперименты показывают, что подкисление экстракта приводит к увеличению выхода флавоноидов на 14%.

В результате определения предложенной методикой содержание суммы флавоноидов в образцах сбора колебалось от 1,27% до 1,42%. Рекомендуем в проект ФСП норму содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в количестве не менее 1,00%.

Результаты статистической обработки свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95,00% находится в пределах $\pm 0,06$. Ошибка методики составляет 4,93%.

Содержание водорастворимых полисахаридов в сборе, установленное гравиметрическим методом, составляло от 8,20% до 9,11%. В проекте ФСП норма содержания суммы указанных веществ рекомендована в количестве не менее 8,00%.

Результаты статистической обработки свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95,00% находится в пределах $\pm 0,39$. Ошибка методики составляет 4,56%.

Кроме вышеперечисленного, для оценки качества антимуtagenного сбора нами определены его основные числовые показатели по методикам Государственной фармакопеи 11 издания (влажность, зольность, примеси, измельченность)

Изучение морфологических и микроскопических признаков сбора

Помимо разработанных числовых показателей и методик качественного обнаружения и количественного определения БАВ нами изучены и определены морфологические и микроскопические признаки сбора, включенные в проект ФСП.

Изучение внешних признаков сбора проводилось в 2 этапа: сначала осматривали невооруженным глазом, отмечая общую структуру, цвет и запах растительной смеси; вкус водного извлечения. Затем сбор диагностировали под стереоскопическим микроскопом МБС-10 (увеличения 8x1; 8x2; 8x4) выделяя все составляющие каждого компонента и детально их характеризую.

Микроскопические признаки сбора установлены на основании анатомического исследования корней одуванчика, цветков календулы; листьев крапивы двудомной; травы хвоща полевого, семян льна. Для этого были приготовлены плоскостные препараты. Для получения объективных результатов анализировали не менее десяти препаратов. Готовые препараты изучали под микроскопом МИКМЕД – 1 (увеличения 7x1,5x8; 7x1,5x40). Фотографировали цифровым фотоаппаратом «Canon» с помощью фотонасадки МФН-3.

Диагностические признаки всех компонентов определялись и соответствовали описанию в частных статьях ГФ 11.

В результате проведенного микроскопического и гистохимического исследования нами выявлен ряд диагностически значимых признаков, позволяющих достоверно определить присутствие каждого компонента сбора (структура эпидермиса, характерные волоски и минеральные включения), а также предложены химические реакции на слизь и инулин.

Получение жидкого экстракта из сбора и его стандартизация

Для выбора рационального метода получения экстракта из антимуtagenного сбора (полиэкстракта) нами был проведен сравнительный анализ влияния ряда факторов на выход БАВ.

При выборе экстрагента методом микроядерного анализа были изучены антимуtagenные свойства экстрактов, полученных на воде, а также на 20%, 40% и 70% этаноле. Результаты представлены в таблице 5, из которой видно, что при введении мышам перед облучением водного экстракта в дозе 50 мг/кг,

наблюдалось выраженное снижение числа микроядер. Близкий уровень антимуtagenной активности продемонстрировал экстракт на 20% этаноле (введенный в дозе 50 мг/кг), снизивший кластогенную активность радиации в виде уменьшения количества микроядер до 3,11% (первые сутки), затем на третьи и пятые сутки снижение числа микроядер в эритроцитах доходило до 3,00% и 2,40% соответственно.

Таблица 5. – Антимуtagenная активность сбора в зависимости от используемого экстрагента ($M \pm m$, средние из 5 определений)

Экспериментальные группы	Доза, мг/кг	Число эритроцитов с микроядрами, %		
		1 сутки	3 сутки	5 сутки
Экстракт водный	50	2,37±0,09*	3,43±0,12*	2,10±0,05*
	150	2,83±0,08*	3,38±0,17*	2,22±0,12*
Экстракт на 20% этаноле+облучение	50	3,11±0,11*	3,00±0,10*	2,40±0,12*
	150	3,45±0,13*	3,11±0,13*	2,32±0,10*
Экстракт на 40% этаноле+облучение	50	4,00±0,27*	4,33±0,23*	3,00±0,15*
	150	4,00±0,10*	4,66±0,23*	3,00±0,12*
Экстракт на 70% этаноле+облучение	50	5,41±0,27*	4,57±0,10*	3,10±0,11*
	150	4,29±0,18*	4,66±0,11*	2,90±0,10
Интактные животные	-	1,80±0,04*	1,83±0,05*	1,70±0,04*
Облученные животные (контроль)	-	5,66±0,11	7,02±0,04	4,10±0,06

примечание:* - отмечены значения достоверно отличающиеся от контроля ($p < 0,05$)

Кроме того, для обоснования выбора экстрагента нами изучена динамика извлечения флавоноидов и экстрактивных веществ из сбора водой, 20%, 40% и 70% этанолом. Определение суммы экстрактивных веществ проводили по методике профессора Ю.Г. Пшукова. В результате установлено, что максимальное количество экстрактивных веществ извлекается водой, а наименьшее – 70% этанолом. При выборе экстрагента остановились на 20% этаноле, т.к. первостепенное значение имеет природа БАВ и микробная устойчивость. Доминирующими БАВ антимуtagenного сбора, являются флавоноиды и полисахариды, известно, что полисахариды лучше всего извлекаются водой, а флавоноиды этанолом 70% концентрации. В случае экстракции водно-спиртовой смесью извлекаются вещества липофильного и гидрофильного характера, а также, замедляется гидролиз. Полученные извлечения, по сравнению с водой, обладают устойчивостью к микробной контаминации. Кроме того, степень антимуtagenной активности экстракта на 20% этаноле приближается к водному экстракту (табл. 5). Поэтому при

разработке технологии полиэкстракта в качестве экстрагента применялся 20% этанол.

Для изучения полноты и скорости экстрагирования, определения расходных норм сырья и экстрагента, а также для управления процессом экстрагирования были определены следующие технологические параметры: влажность, содержание экстрактивных веществ, доброкачественность сырья, насыпная масса, коэффициенты наполнения сухого и набухшего сырья, коэффициенты вытеснения, образования внутреннего сока, поглощения сырья и насыпной массы.

С помощью полученных коэффициентов наполнения сухого и набухшего сырья осуществляли подбор рабочего объема диффузоров. Основываясь на данных литературы и используя коэффициенты вытеснения, образования внутреннего сока, поглощения сырья и насыпную массу, определяли количество экстрагента, необходимое для настаивания и перколяции.

Для получения стандартизованного экстракта сбора применяли метод реперколяции, турбоэкстракции (вихревой) и роторно-кавитационный метод (с оптимизацией процесса экстрагирования ультразвуком). На данном этапе, изучался выход флавоноидов, полисахаридов, каротиноидов и химических элементов, а также экстрактивных веществ в зависимости от способа экстрагирования. Сравнение содержания БАВ и степени истощенности сырья, представленное в таблице 6, демонстрирует возможность использования всех методов для получения экстракта.

Таблица 6. – Сравнительная характеристика методов экстрагирования

Метод получения экстракта	БАВ, %					
	экстрактивные вещества		полисахариды		флавоноиды	
	В экстракте	Истощение	В экстракте	Истощение	В экстракте	Истощение
Реперколяция	15,9±0,06	68,6±0,6	9,7±0,22	58,8±0,12	0,68±0,17	55,3±0,11
Вихревая экстракция	20,7±0,12	76,1±0,8	10,2±0,18	60,3±0,9	1,07±0,05	74,8±0,10
Роторно-кавитационная	16,6±0,10	71,3±0,8	9,65±0,11	58,5±0,13	0,84±0,12	68,3±0,19

Вместе с тем, данные, представленные в таблице 6, показывают, что предпочтительным для получения экстракционных препаратов является метод вихревой экстракции так как позволяет наиболее полно извлечь полисахариды, флавоноиды и экстрактивные вещества, а также добиться наибольшей степени истощенности сырья. К преимуществам указанного метода можно отнести сокращение времени экстракции растительного материала до 4 часов вместо 7 суток. При этом основными факторами, влияющими на процесс экстракции, являются температурный режим и интенсивное перемешивание сырья.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами была предложена технология получения жидкого экстракта методом вихревой экстракции.

Стандартизацию жидкого экстракта рекомендовано проводить по общепринятым показателям, а также содержанию флавоноидов и полисахаридов (табл. 7).

Таблица 7. – Параметры качества полиэкстракта

№	Параметры качества	Значение параметра
1	Внешний вид	жидкость темно-бурого цвета, характерного запаха
2	Концентрация этанола, %v	19,59±0,95
3	Плотность, г/см	0,9486 ± 0,03
4	Флавоноиды, %	1,07±0,05
5	Полисахариды, %	10,2±0,18
6	Сухой остаток, %	20,7±0,12
7	Тяжелые металлы	удовлетв. (по сырью)

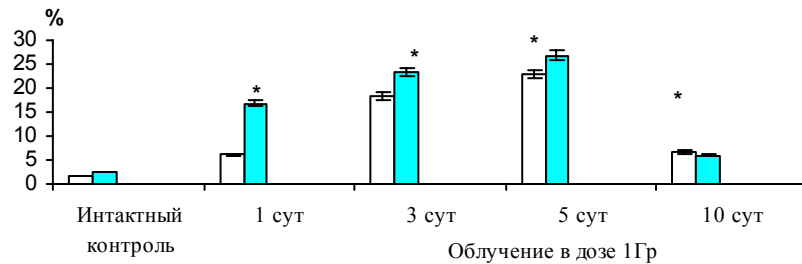
Оценка безвредности (острой токсичности) жидкого экстракта

Острую токсичность экстракта сбора изучали при пероральном введении мышам в дозах от 5000 до 10000 мг/кг. Результаты выполненных исследований показали, что экстракт из сбора согласно ГОСТ 121007-76 (Государственный стандарт на вредные вещества) можно отнести к 4 классу: «вещества малоопасные».

Оценка антимутагенной активности жидкого экстракта

В эксперименте определялось влияние экстракта на мутагенную активность диоксида (ДО) и циклофосфана (ЦФ). В результате установлено, что на фоне полного отсутствия мутагенных свойств у исследуемого экстракта он обладает антимутагенными свойствами, что выражается в способности его БАВ снижать частоту индуцированных ЦФ и ДО микроядер в периферической крови мышей.

Для изучения влияния экстракта на цитогенетические нарушения хромосом, вызванные радиацией, проводили эксперименты на мышях, которым вводили экстракт из сбора, а затем облучали рентгеновскими лучами в дозе 1Гр. Анализ хромосом и приготовление препаратов из клеток костного мозга проводился обычным способом. Результаты исследований обобщены в виде диаграмм на рисунках 6,7. Как видно из рисунка 6, облучение мышей в дозе 1 Гр. индуцировало через 1 сут. $6,2 \pm 0,9\%$ клеток со структурными нарушениями хромосом (в контроле - $1,7 \pm 0,4\%$; $p < 0,01$) и $16,8 \pm 1,6\%$ клеток с измененным числом хромосом (в контроле - $2,6 \pm 0,4\%$; $p < 0,01$). Через 2 сут. частота наблюдаемых клеток со структурными нарушениями хромосом возрастала до $18,3 \pm 1,2\%$, а клеток с измененным числом хромосом – до $23,3 \pm 1,6\%$.



Примечание: □ - клеток со структурными aberrациями, ■ - клеток с измененным числом хромосом

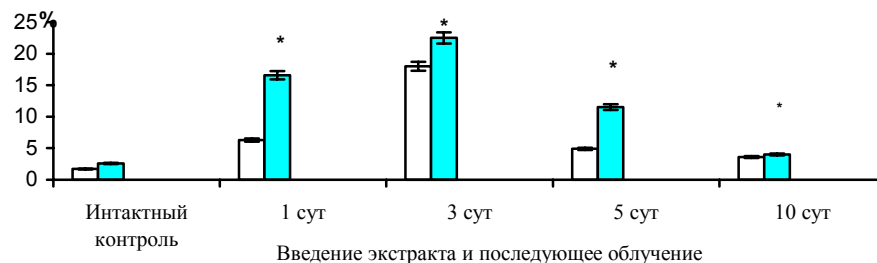
Рисунок 6.– Уровень клеток (%) с цитогенетическими нарушениями в клетках костного мозга мышей, подвергнутых облучению в дозе 1Гр

Через 5 сут. соответствующие показатели возрастали до $22,8 \pm 1,1$ и $26,7 \pm 1,2\%$ (во всех случаях $p < 0,01$), а через 10 сут. наблюдалась постепенная нормализация в частоте клеток с нарушениями в числе и структуре хромосом (соответственно $5,9 \pm 0,4$ и $6,7 \pm 0,5\%$; $p < 0,05$).

Экстракт из сбора лекарственных растений не оказывал заметного защитного действия на первый день после облучения (число клеток со структурными aberrациями $6,3 \pm 0,4\%$, с измененным числом хромосом $16,6 \pm 1,2\%$) (рис. 7). На 3 сутки после введения, экстракт также не оказывал значительного влияния на частоту клеток с хромосомными нарушениями у облученных мышей (частота клеток со структурными aberrациями $18,0 \pm 1,4\%$, с измененным числом хромосом $22,5 \pm 0,7\%$), и только на 5 сутки после введения экстракта происходило заметное уменьшение числа клеток с нарушениями в числе и структуре хромосом. Так, если у мышей через 5 сут. после облучения частота клеток со структурными нарушениями составляла $22,8 \pm 1,8\%$, то при введении экстракта сбора на этом фоне - $4,9 \pm 0,7\%$ ($p < 0,05$), а частота клеток с измененным числом хромосом снижалась с $26,7 \pm 1,0\%$ до

11,5±1,2% (p<0,05).

Как показывают данные рисунка 7, наиболее значительное уменьшение числа клеток с нарушениями в структуре и числе хромосом наблюдалось на 10 суток после введения экстракта. Так, число клеток с нарушениями в структуре хромосом после облучения составляло 3,6±0,9%, а число клеток с измененным числом хромосом - 4,0±0,6%, т.е. снижалось до уровня, близкого контрольному (p<0,05).



Примечание: □ - клеток со структурными аберрациями, ■ - клеток с измененным числом хромосом

Рисунок 7.– Уровень клеток (%) с цитогенетическими нарушениями в клетках костного мозга мышей, подвергнутых облучению в дозе 1Гр на фоне введения экстракта сбора.

Таким образом, совокупность описанных данных дает основание утверждать, что экстракт из сбора способен значительно уменьшать число клеток с цитогенетическими нарушениями (в числе и структуре хромосом), вызванными ионизирующей радиацией.

Результаты изучения последствий стимуляции ДНК-репарации УФ-облучением и введением 4-нитрохиолин-1-оксида (4-НХО), представленные в таблице 8, свидетельствуют о том, что индекс стимуляции различен при введении витамина А и экстракта из сбора.

Если витамин А слабо влиял на этот показатель, преимущественно в сторону его снижения, то при введении экстрактов растений этот показатель был достоверно выше, чем в контроле: 5,7±1,1 при стимуляции УФ-лучами (в контроле 2,9±0,4) и 7,6±1,8 при стимуляции 4-нитрохиолин-1-оксидом – (в контроле 3,2±0,4).

Таким образом, описанные данные позволяют предполагать, что способность к активации ДНК-репаративных процессов является одним из возможных механизмов антимуtagenного эффекта экстракта из сбора лекарственных растений. Усиление под влиянием экстракта процессов репарации ДНК, вероятно, не единственная причина его антимуtagenного действия. В нем могут участвовать и процессы связывания биологически

активными веществами сбора свободных радикалов, образующихся под влиянием мутагенов.

Таблица 8. – Уровень активности эксцизионных ДНК-репаративных процессов в культурах Т – лимфоцитов после введения экстракта из сбора и витамина А

Показатели		Контроль	Больные	
			после введения витамина А	после введения экстракта
Индекс стимуляции ДНК-репаративной активности (в усл. ед.)	УФ	2,9±0,4	2,2±0,2*	5,7±1,1*
	4-НХО	3,2±0,4	2,0±0,3*	7,6±1,8**

* - достоверные отличия от контроля: одной при $p < 0,01$; двумя при $p < 0,05$

Для подтверждения данного предположения изучали антиоксидантную активность жидкого экстракта из сбора. Исследование проводили, используя метод катодной вольтамперометрии. Результаты исследований показали (табл. 9), что экстракт из сбора обладает выраженным антиоксидантным действием (значение К – коэффициента антиоксидантной активности, составило 0,412 и 0,602 мкмоль/л при концентрациях $3.8 \cdot 10^{-4}$ и $3.8 \cdot 10^{-3}$ соответственно) сравнимым с эффектом препаратов сравнения – аскорбиновой кислоты и дигидрохверцетина.

Таблица 9. – Антиоксидантная активность экстракта из сбора на фоне препаратов сравнения – аскорбиновой кислоты (АсКис) и дигидрохверцетина (ДГКвер)

образец	С раб, г/мл	К, моль/л мин	г	Sr
экстракт	$3.8 \cdot 10^{-4}$	0.412	0.99	0.043
	$3.8 \cdot 10^{-3}$	0.602	0.99	0.042
ДГКвер	$3.85 \cdot 10^{-5}$	0.589	0.989	0.032
	$1.92 \cdot 10^{-4}$	0.781	0.987	0.038
АсКис	$3.97 \cdot 10^{-4}$	0.683	0.995	0.062
	$1.19 \cdot 10^{-3}$	1.15	0.983	0.054

Вышеописанные данные дают основание считать, что выявленная антиоксидантная активность может являться одним из механизмов антимуtagenного действия экстракта из сбора.

ВЫВОДЫ:

1. В результате экспериментальных исследований водных экстрактов полученных из сырья 41 вида растений произрастающих и культивируемых на территории Сибири была научно обоснована пропись антимуутагенного сбора, в состав которой вошли в равных количествах листья крапивы двудомной, цветки ноготков лекарственных, трава хвоща полевого, семена льна посевного, и корни одуванчика лекарственного.
2. В составе антимуутагенного сбора установлено содержание основных групп БАВ в следующих количествах: суммы фенольных соединений – 2,22%, флавоноидов – 1,36%, фенолкарбоновых кислот – 0,75%, кумаринов – 0,05%, суммы полисахаридов – 16,48%, водорастворимых полисахаридов – 8,65%, пектиновых веществ – 0,98%, гемицеллюлозы А – 4,86%, гемицеллюлозы Б – 1,99%; аскорбиновой кислоты – 46мг%; витамина К – 0,15%, каротиноидов – 121мг%, хлорофилла – 13мг%.
3. Элементный состав сбора обладающего антимуутагенным действием представлен 28 макро и микроэлементами, из которых в наибольших количествах содержатся такие жизненно важные элементы, как кальций (0,89%), железо (0,032%), цинк ($6,3 \cdot 10^{-4}$), кобальт ($0,22 \cdot 10^{-4}$), и селен ($0,30 \cdot 10^{-4}$).
4. В проект ФСП для определения доброкачественности предложенного сбора рекомендовано включить следующие показатели качества: содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин не менее 1%; суммы водорастворимых полисахаридов не менее 8%, экстрактивных веществ извлекаемых 20% этанолом не менее 20%; влажность не более 14%, золы общей не более 13%, золы нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 4%, частиц, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 6 мм не более 1,00 %, частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 0,1 мм не более 1,00 %, органической примеси не более 2%, минеральной примеси не более 3%.
5. Для идентификации сбора предложены внешние и микроскопические диагностические признаки, входящих в него компонентов (структура эпидермиса, характерные волоски и минеральные включения), а также химические реакции на слизь и инулин.
6. Показана возможность получения стандартизованного экстракта из антимуутагенного сбора методами турбозэкстракции, реперколяции, а также роторно-кавитационным методом.
7. Изучение специфической активности жидкого экстракта сбора показало, что он снижает мутагенное действие ионизирующей радиации, диоксидина и циклофосфана у мышей, активизирует процессы эксцизионной ДНК-репарации в культуре клеток, проявляет антиоксидантную активность и вызывает значительное уменьшение числа клеток с нарушениями в структуре и числе хромосом вызванные рентгеновским облучением.

ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ СЛЕДУЮЩИЕ РАБОТЫ:

1. Изучение антимуtagenной активности природных биологически активных веществ гречихи посевной // Сб. статей по результатам 60-ой юбилейной конференции им. Н.И. Пирогова. – Томск, 2001.- С. 131-132 (Соавт.: Д.Л. Стахеев).
2. Изучение антикластогенной активности некоторых представителей флоры Сибири // Сб. статей по результатам Всероссийской 61-ой итоговой научной конференции им. Н.И. Пирогова. - Томск, 2002. – С. 199-200 (Соавт. А.Г. Семенов, Ю.А. Родина).
3. Исследование антимуtagenной активности представителей флоры Сибири // Сб. статей по результатам Международной 62-ой итоговой студенческой конференции им. Н.И. Пирогова. – Томск, 2003. – С. 214-215 (Соавт. А.Г. Семенов, Ю.А. Родина).
4. Радиопротекторное действие препаратов растительного происхождения // Сб. статей по результатам Международной 62-ой итоговой студенческой конференции им. Н.И. Пирогова. – Томск, 2003. – С. 192 (Соавт. А.Г. Семенов).
5. Изучение антикластогенной активности представителей Сибирской флоры // Сб. статей по материалам четвертого конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». – Томск, 2003. – С.217-218 (Соавт. Ю.А. Родина, М.В. Белоусов).
6. Экологическое состояние Томской области и поиск природных биологически активных веществ с антимуtagenным действием // Сборник научных трудов «доклады Томского государственного университета систем управления и радиоэлектроники». – Томск, 2003. – С. 36-43 (Соавт. С.Е. Дмитрук, Н.Н. Ильинских).
7. Растения и антимуtagenная защита организма // Сборник научных трудов «Информационные системы мониторинга окружающей среды». – Томск, 2003. – С.59-63 (Соавт. И.В. Федько, Г.В. Ефимова).
8. Модификация радиационного мутагенеза лекарственными средствами растительного происхождения // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии – сборник научных работ. - Томск, 2004.- т.3, №1. - С.20-22 (Соавт. М.В. Белоусов, Е.В. Басова, А.Г. Семенов).
9. Изменение ДНК-репаративных процессов в культурах Т-лимфоцитов человека под влиянием экстракта из сбора лекарственных растений // Сб. статей по мат. пятого конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». – Томск, 2004. – С. 345-346 (Соавт. Е.Н. Ильинских, Л.Н. Ефимова).
10. Поиск антимуtagenнов растительного происхождения // Сб. трудов по материалам 59-ой научной конференции по фармакологии и фармации «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической

- продукции. – Пятигорск, 2004. – С. 275 (Соавт. В.Ю. Андреева, И.В. Федько, В.В. Шейкин).
11. Исследование качественного состава экстракта антимутагенного сбора методом тонкослойной хроматографии // Материалы IV межрегиональной научно-практической конференции «Фармация XXI века». – Новосибирск, 2004.– С.100-102 (Соавт. С.Е. Дмитрук, Ф.М. Смагулова, Б.И. Тулеуов, С.М. Адекенов).
 12. Исследование элементного состава антимутагенного сбора // Лекарственные растения в фармакологии и фармации: тезисы докладов научной конференции посвященной 50-летию Алтайского государственного медицинского университета. – Барнаул, 2004. – С.60-61 (Соавт. Б.И. Тулеуов, А.В. Кудрин, Ф.М. Смагулова, С.М. Адекенов).
 13. Химический состав и антимутагенные свойства некоторых представителей флоры Сибири // Молодежь в XXI веке: Материалы пятой межрегиональной научно-практической конференции. – Барнаул, 2004. – С.197-201.
 14. Разработка товароведческих показателей антимутагенного сбора // Молодежь в XXI веке: Материалы пятой межрегиональной научно-практической конференции. – Барнаул, 2004. – С.202-203 (Соавт. А.Ю. Исаев, Л.Н. Ефимова).
 15. Антимутагенные свойства экстрактов багульника болотного // Фармация. – 2004. - №4. – С.40-41 (Соавт. Е.В. Басова, М.В. Белоусов, М.С. Юсубов, С.Е. Дмитрук).
 16. Антимутагенная активность лекарственных растений Сибирского региона // Бюллетень Сибирской медицины. – 2004. – Т.3, -№3. – С.17-26 (Соавт. С.И. Дмитрук, Н.Н. Ильинских).
 17. Лекарственное средство, обладающее антимутагенным действием. (С.Н. Ефимов, С.Е. Дмитрук, Н.Н. Ильинских). – Патентная справка на изобретение №2004116287 от 28.05.2004 г.