

На правах рукописи



КУДИНОВА СВЕТЛАНА ПЕТРОВНА

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ И ФАРМАКО-
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ БЕТА-КАРОТИНА

16.00.04 – ветеринарная фармакология с токсикологией

03.00.23 – биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Краснодар 2003

Работа выполнена в Краснодарском научно-исследовательском ветеринарном институте и ЗАО «Роскарфарм».

Научные консультанты: заслуженный деятель науки Российской Федерации, доктор ветеринарных наук, профессор Антипов В.А.

доктор технических наук, профессор
Казарян Р.В.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Терехов В.И.

доктор ветеринарных наук, профессор
Кузнецов Н.И.

доктор технических наук, профессор
Донченко Л.В.

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии

Защита состоится « 28 » октября 2003 г. в « 10⁰⁰ » часов на заседании диссертационного совета Д 220.038.07 в Кубанском государственном аграрном университете (350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кубанского государственного аграрного университета.

Автореферат разослан « 27 » сентября 2003 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



В.Н. Боровой

2003-A
15065

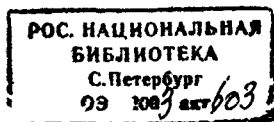
1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одной из задач стоящей перед фармакологической наукой и практикой является поиск средств, повышающих сопротивляемость организма человека и животных вредным воздействиям окружающей среды. На организм человека и животных действуют новые антропогенно-экологические факторы, которые приводят к ослаблению сопротивляемости организма, нарушению обмена веществ, возникновению различных заболеваний, в том числе онкологических. В связи с этим в мире растет спрос на натуральные природные средства профилактики и лечения заболеваний человека и животных.

Важной задачей науки является создание технологий производства и применения биологически активных веществ. Одним из таких веществ является природный бета-каротин. Дефицит бета-каротина в организме человека и животных до сего времени, в основном, восполняется за счет использования овощей, фруктов, зеленых частей растений, в которых он содержится.

Интерес к всестороннему изучению бета-каротина возник после того, как было обнаружено, что кроме провитаминной активности он участвует в ряде сложных биохимических процессов в организме (Bendich A., 1988). Бета-каротин обладает антиоксидантными, антиканцерогенными, антимуtagenными и иммуностимулирующими свойствами (Плесцитый К.Д., 1978, 1981; Сергеев А.Г., 1986; Букин Ю.В., 1986, 1995; Peto R., et al., 1981, Krinski N.I., 1989, 1994, 1998; Mayer H., Bollag W., Hanni R. et al., 1978, Bendich A., Olson J.A., 1988, Zhang Z.W. et al., 2000). Поэтому препараты бета-каротина находят широкое применение в медицине, ветеринарии и животноводстве при профилактике и лечении заболеваний. (Сергеев А.Г., 1983, Зернов В.Г., 1979; Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И., 1999; Букин Ю.В., 1992, Дорогокупля А.Г., Троицкой Е.Г., Адильгиреева Л.Х. и др., 1979; Буюклинская О.В., 1992; Mathews-Roth M.M., 1982; Riegger C.B., 1990; Alexander M., Newmark H., Miller R.G., 1985; Duthie G.G., 1990; Singkh Vishwan, 1994; Hennekens Charles H., 1997, 1999).

В условиях растущей потребности в препаратах бета-каротина важным



является вопрос изыскания его источников. Недостатком получения бета-каротина из растительного сырья является его дефицит, низкое содержание бета-каротина, зависимость накопления от природно-климатических условий, сложность регулирования этого процесса. Очевидными преимуществами обладает метод получения бета-каротина микробиологическим синтезом из культуры гриба *Blakeslea trispora*.

Впервые исследования по получению бета-каротина из этой культуры были проведены д.т.н. Казаряном Р.В. (1978, 1990) и направлены на улучшение качества получаемого масляного экстракта и совершенствование метода извлечения бета-каротина из мицелиальной массы с целью получения кристаллического бета-каротина. Настоящая работа выполнена в развитие этих исследований и посвящена разработке технологии производства фармакопейной субстанции бета-каротина из мицелиальной массы культуры *Blakeslea trispora* и использование ее при разработке лекарственного и ветеринарного препаратов.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является разработка технологии производства субстанции природного бета-каротина из мицелиальной массы культуры гриба *Blakeslea trispora*, получение на ее основе лекарственных препаратов, исследование их фармако-токсикологических свойств и лечебно-профилактической эффективности в медицине, ветеринарии и животноводстве.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

- разработать способы, позволяющие получить каротинсодержащую мицелиальную массу с высоким содержанием бета-каротина;
- изучить состояние бета-каротина в клетке мицелиальной массы в процессе ферментации, изучить качество мицелиальной массы и выделенного из нее липидно-каротинового комплекса;
- изучить условия получения высококонцентрированных растворов бета-каротина в растительном масле, состав и распределение компонентов липидной системы при кристаллизации бета-каротина и разработать способы очистки кристаллов и масляного экстракта;

- разработать технологию получения субстанции кристаллического бета-каротина и стандартизировать показатели качества;
- разработать технологию производства препарата каролин лекарственного и ветеринарного назначения и методы контроля их качественных показателей;
- организовать промышленное производство препаратов бета-каротина и обеспечить внедрение их в медицинскую, ветеринарную практику и животноводство;
- дать характеристику основных фармако-токсикологических свойств препаратов;
- разработать основные показания к применению препарата каролин в медицине, ветеринарии и животноводстве.

Научная новизна работы.

Получен новый штамм гриба *Blakeslea trispora* КР 76* КР 86* и разработан состав питательной среды, в которой в качестве источников белков, жиров, углеводов, антиоксиданта и стимулятора каротиногенеза используются отходы масложировой и крахмалопаточной промышленности, а также отходы, полученные при производстве кристаллического бета-каротина.

Изучено состояние бета-каротина в клетке *Blakeslea trispora* в процессе ферментации и разработан способ извлечения из мицелиальной массы бета-каротина, растворенного в клеточных липидах.

На основе результатов исследований состава липидов промышленных образцов мицелиальной массы и свойств кристаллического бета-каротина, разработан способ извлечения его противоточной многоступенчатой экстракцией, в системе твердое тело-жидкость, растительным маслом. Определены основные параметры экстракции.

Изучен процесс кристаллизации бета-каротина из масляных экстрактов и состав образующихся осадков. На основе этих данных, разработаны способы очистки кристаллов бета-каротина и масляных экстрактов от сопутствующих веществ.

Стандартизированы показатели качества субстанции кристаллического бета-каротина, разработаны методы контроля.

Выявлено влияние размеров и формы кристаллов на скорость растворения бета-каротина в растительном масле. Изучена кинетика окисления бета-каротина в растительном масле, в растворе органического растворителя и в кристаллическом виде.

Дана характеристика физико-химических свойств препарата каролин лекарственного и ветеринарного качества и определены методы контроля.

В опытах, проведенных на животных, изучены изменения клинических, гематологических, биохимических, патоморфологических показателей, дана оценка острой и субхронической токсичности, аллергенных и иммунотоксичных свойств, местно-раздражающего действия, объективно отражающих безвредность каролина.

Выявлена профилактическая и терапевтическая эффективность лекарственного препарата каролин при заболеваниях, связанных с усилением свободно-радикальных реакций.

Научная новизна работы подтверждена 3 авторскими свидетельствами и 14 патентами Российской Федерации.

Практическая значимость.

На основе проведенных исследований, разработана технология промышленного производства субстанции кристаллического бета-каротина и рафинированных масляных экстрактов его, а также технология получения каролина лекарственного и ветеринарного качества.

Как лечебно-профилактическое средство, каролин медицинского качества рекомендуется применять при состояниях, характеризующихся усилением свободно-радикальных реакций (воздействие малых доз радиации, рентгенологическое обследование, лучевая и химиотерапия, при опухолевых заболеваниях, лазерная терапия, контакт с ядохимикатами, иммунодефицитные состояния). В качестве лечебного средства каролин применяют в комплексной терапии, связанной с нарушением регенерации эпителия (язвенной болезни желудка, и 12-

перстной кишки, эрозивного гастрита, дуоденита, гепатита, холецистита, неспецифического язвенного колита, дисбактериоза, при острых респираторных заболеваниях). При хронических бронхолегочных и гинекологических заболеваниях, заболеваниях кожи (раны, ожоги, отморожения, трофические язвы, кератозы, псориаз, экзема и другие дерматозы). (Инструкция по применению препарата каролин, регистрационный номер 95/292/6, утвержденная Фармакологическим государственным комитетом Минздрава РФ).

В качестве лечебно-профилактического средства, каролин ветеринарного качества рекомендуется применять для нормализации обмена веществ, при профилактике задержания последа, послеродовых эндометритов и нарушений воспроизводительной функции у коров и свиноматок, повышения молочности свиноматок и сохранности поросят, повышения выводимости и сохранности цыплят, улучшения качества яиц. (Наставление по применению препарата каролин в ветеринарии, регистрационный номер ПВР-2-4.0/00541, утвержденное Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства Российской Федерации).

Результаты исследований могут быть использованы при составлении руководств и справочников по фармакологии, терапии и профилактике заболеваний человека и животных.

Внедрение результатов исследований. Результаты исследований нашли отражение в документах, утвержденных (согласованных) Департаментом Государственного контроля качества, эффективности и безопасности лекарственных средств и медицинской техники и Фармакопейным государственным комитетом: Бетакаротин – Фармакопейная статья ФС 42-3687-99 от 03.02.2000; Каролин – Фармакопейная статья 42-3868-99 от 03.02.2000 г.; Инструкция по применению препарата Каролин, регистрационный номер 95/292/6 от 12.09.1995 г.; промышленный регламент на производство субстанции бета-каротина, промышленный регламент на производство препарата каролин, рекомендованные к утверждению технологической комиссией НПО «Витамины» (г. Москва).

Результаты исследований нашли отражение в документах, утвержденных (согласованных) Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства Российской Федерации: Каролин – Технические условия ТУ 9141-003-41341380-01; наставление по применению препарата каролин в ветеринарии - регистрационный номер: ПВР-2-4.0/00541...

Препарат каролин медицинского качества выпускается ЗАО «Роскар-фарм» по лицензии Минздрава РФ с 1996 года и реализуется через аптечную сеть.

Препарат каролин ветеринарного качества выпускается ЗАО «Роскар-фарм» с 1997 года и реализуется в ряде регионов РФ.

Апробация работы. Основные научные результаты работы были доложены на Всесоюзной конференции «Фосфолипиды растительных и микробных липидов – современный уровень технологии и исследований», г. Краснодар, 1979 г.; на конференции «Использование биомассы микроорганизмов для пищевых целей», г. Пущино, 1984 г.; на международной научно-технической конференции «Улучшение качества и расширение ассортимента при маслодобывании и маслопереработке», г. Пловдив, НРБ, 1985 г.; на международной научно-технической конференции «Новые тенденции в развитии мало-жировой промышленности», г. Пловдив, НРБ, 1987 г.; на Всесоюзном совещании «Реализация научно-технической программы «Витаминизация пищи», г. Углич, 1990 г.; на У1 Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», г. Москва, 1999 г.; на научно-практической конференции, посвященной 55-летию ГУ Краснодарской НИВС, г. Краснодар, 2001 г.; на 5 Международном съезде «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения», г. Санкт-Петербург, 2001 г.; на международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях», г. Воронеж, 2002 г., на Всероссийской научно-производственной конференции по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии, г. Казань, 2002 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 45 научных работ, в том числе: 1 монография, 14 патентов и 3 авторских свидетельства.

Структура и объем работы. Работа изложена на 353 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических предложений, списка литературы и приложений. В работе использовано 384 источника литературы, в том числе 225 зарубежных авторов. Диссертация содержит 79 таблиц и 21 рисунок.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнялась с 1978 по 2002 год в условиях Кубанского государственного технологического университета, цеха микробиологического каротина Верхнеднепровского крахмалопаточного комбината, Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института, ЗАО «Роскарфарм», в хозяйствах Краснодарского края и Витебской области.

Проведение лабораторных экспериментов осуществляли по схеме, приведенной на рис 1.

Общетоксические характеристики лекарственного каролина изучали путем определения параметров острой и субхронической токсичности на базе Центра по химии лекарственных средств Всероссийского научно-исследовательского химико-фармацевтического института (ЦХЛС ВНИИХФИ г. Москва), в соответствии с требованиями Фармакологического комитета.

Аллергенную активность и иммунотоксические свойства лекарственного средства каролин изучали на базе научно-исследовательского технологического института антибиотиков и ферментов (НИТИАФ, г. Санкт-Петербург) в соответствии с требованиями Фармакологического комитета.

Эффективность применения каролина в медицине изучали на базе Республиканского липидного лечебно-диагностического и консультативного



Рис. 1. Схема постановки эксперимента

центра под руководством д.м.н., профессора Чиркина А.А. (Республика Беларусь, г. Витебск).

Исследования по накоплению растворенного и кристаллического бета-каротина в процессе ферментации проводили в цехе микробиологического каротина Верхнеднепровского крахмалопаточного комбината.

Исследование кинетики окисления бета-каротина проводили на базе Армянского филиала Института реактивов и особо чистых химических веществ, по методике Цепалова В. Ф. (1964), при участии д.х.н. Вардапьяна Р.Л.

Токсикологические характеристики и фармакологические свойства каротина ветеринарного качества изучали в условиях отдела ветеринарной фармации Краснодарского НИВИ.

Объектами исследования при разработке технологии производства мицелиальной массы и производства кристаллического бета-каротина из нее служили промышленные образцы культуры *Blakeslea trispora*, выращенные в условиях Свердловского производственного объединения «Уралсинтез» и Верхнеднепровского крахмалопаточного комбината. Для работы использовали мицелиальную массу, образующуюся по стадиям ферментации, а также мицелиальную массу, высушенную до влажности 6-7 %, измельченную в производственных условиях и не измельченную.

Объектами исследования служили разработанные препараты: бета-каротин субстанция, каротин ветеринарного и медицинского качества, произведенные предприятием ЗАО «Роскарфарм».

Разработку нормативно-технической документации (НТД) проводили с целью стандартизации и контроля субстанции бета-каротина, препарата каротин лекарственного и ветеринарного назначения, оценки их качества. В НТД регламентированы методы контроля на предмет выявления изменений параметров, обеспечивающих физические, химические, биологические и лечебно-профилактические свойства препаратов бета-каротина.

Изучение острой токсичности лекарственного препарата каротин проводили на белых мышах, крысах, поросятах, телятах и цыплятах.

В опытах по определению токсичности брали клинически здоровых животных. В подготовительный период их кормили 2 раза в сутки, воду давали неограниченно. За 4 часа до опыта кормление и поение животных прекращали. Клинически животных исследовали через 1, 3 и 4 часа после введения препарата, а затем дважды в день (утром и вечером), на протяжении 14 дней.

Оценку острой токсичности карolina осуществляли путем однократного внутрижелудочного введения препарата в дозах, превышающих терапевтические в количестве: мышам 50 мл/кг, крысам 46,6 мл/кг, пороссятам, цыплятам и телятам 26 мл/кг.

Параметры субхронической токсичности карolina изучали на белых крысах в течение одного месяца. Доза введения (3 мл/кг и 15 мл/кг) превышала максимальную терапевтическую дозу для человека в 6 и 30 раз. Субхроническую токсичность карolina на телятах, пороссятах и цыплятах изучали в течение 3-х месяцев. Каролин задавали ежедневно с кормом, по непрерывной схеме в дозах, превышающих рекомендуемые терапевтические в 3-5 раз.

В гематологических исследованиях количество эритроцитов и лейкоцитов подсчитывали на приборе Лаборскель PSL1 фирмы Медикор. Гемоглобин определяли с помощью эритрогемометра. Для подсчета количества тромбоцитов и вывода лейкоцитарной формулы были использованы мазки крови, окрашенные по Романовскому-Гимза. Гематокрит определяли с помощью центрифуги ТН-21. В сыворотке крови животных определяли активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), содержание холестерина, общего белка, альбумина, β - и γ -глобулинов, сахара в крови с использованием стандартных наборов.

Патоморфологические исследования проводили на материале внутренних органов, фиксированном в 10% формалине.

Местно-раздражающее действие на желудочно-кишечный тракт оценивали в процессе патоморфологического исследования при макроскопическом и микроскопическом изучении.

Двигательную активность регистрировали на установке Digiskan analyser в течение 15 минутного интервала. Определяли артериальное давление бескровным методом на установке Ugo Basil.

Изучение аллергенных и иммунотоксичных свойств бета-каротина проводили на морских свинках, мышах и белых беспородных крысах. Аллергенные свойства препарата изучали по реакции активной системной анафилаксии, активной кожной анафилаксии, реакции гиперчувствительности замедленного типа к препарату, реакции иммунных комплексов, непрямой реакции дегрануляции тучных клеток крыс.

Влияние бета-каротина на иммунную систему оценивали по методикам: функциональной активности макрофагов и реакции бласттрансформации.

Местнораздражающее действие каротина изучали методом накожных аппликаций на морских свинках и кроликах.

О качестве мяса животных после применения каротина судили по результатам ветеринарно-санитарной оценки, которую проводили с использованием общепринятых методов.

Фармакодинамику каротина определяли по его влиянию на некоторые показатели белкового, витаминного и минерального обмена, морфологическому составу крови.

Изучение фармакокинетики включало многократное определение уровня каротина и витамина А в сыворотке крови и печени после введения каротина.

Содержание каротина и витамина А определяли (по Бессею, в модификации Анисовой), мочевины (цветной реакцией с диацетилмонооксимом и тиосемикарбазидом), общего кальция (с орто-кризолфталесином), неорганического фосфора (с ванадат-молибдатным реактивом), глюкозу (ферментативно). Бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК) определяли по Смирновой О.В. и Кузьминой Т.А. (1966), лизоцимную (ЛАСК) – по Дорофейчук Д.Г., фагоцитарную активность лейкоцитов по Болотникову И.А. (1980).

При изучении эффективности каролина в медицине больные получали препарат каролин три раза в день с пищей в количестве 45-60 мл. При лечении эндометриоза и стенокардии в течение 14-18 дней, при лечении инфильтративной формы туберкулеза легких в течение 2-х месяцев. В плазме крови, полученной в утренние часы после 12 часового голодания, определяли показатели липидтранспортной системы (ЛТС), содержание общего холестерина плазмы, холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), триглицеринов, белково-липидный состав основных классов липопротеинов по методикам (под ред. Перовой Н.В., 1983). Показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малоновый диальдегид (МДА) и антиокислительную активность (АО), степень накопления МДА и перекисную устойчивость в эритроцитах определяли по методикам (Антонов М.П., Тофило А.П., Богданова К.И., 1986). Для оценки первичных механизмов действия лазерного излучения на клетки готовили мазки крови и после окраски их акридиновым оранжевым оценивали степень спирализации ДНК в ядрах лейкоцитов и лимфоцитов, с помощью микроспектрофлуориметра МСФ-2 по методике (Гордон Р.Я., Карнаухов В.И., 1981). Содержание фосфолипидов в сыворотке крови определяли по Свенбергу и Свеннерхолму. При анализе соотношения белков и липидов в составе основных классов липопротеинов использовали подходы, рекомендованные М.А. Антоновым с соавторами (1986). Содержание белков определяли спектрофотометрическим методом. Антиокислительную активности сыворотки крови определяли по тесту накопления МДА (Клебанов Г.И. с соавт., 1988). Количество МДА определяли по методу, описанному Андреевой Л.И с соавторами, (1988). В сыворотке крови определяли активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, панкреатической амилазы, щелочной фосфатазы, гаммаглутаминилтрансферазы, содержание билирубина, глюкозы, мочевины и креатина с помощью тест-полосок и автоанализатора «Рефлотрон» (Австрия).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Получение и состав мицелиальной массы культуры гриба *Blakeslea trispora*

Наиболее активным продуцентом бета-каротина является гетероталлический гриб *Blakeslea trispora*, относящийся к порядку *Mucorales*.

Для производства мицелиальной массы необходимого качества нами получена новая высокоэффективная пара штаммов КР 74⁺ и КР 86⁻ гриба культуры *Blakeslea trispora*.

В условиях производства указанная пара штаммов обеспечивает удельную продуктивность 40-45 г бета-каротина на 1 кг высушенной мицелиальной массы (патент РФ №2177505 от 27.12.2001).

Для снижения себестоимости и повышения активности мицелиальной массы, нами разработан состав питательной среды. В ней в качестве источников жиров, белков и углеводов, а также стимулятора каротиногенеза и антиоксиданта используются отходы масложировой и крахмалопаточной промышленности, а также отходы и вторичные продукты производства кристаллического бета-каротина: подсолнечный шрот 8-12%; меласса и зеленая патока 1-2%; баковые отстои (фуз) 4,2-5%. В качестве стимулятора каротинообразования использовали отходы, полученные при дезодорации растительных масел в количестве 0,05-0,15%. В качестве антиоксиданта использовали отходы, полученные при производстве кристаллического бета-каротина, в количестве 0,03-0,05% (патент РФ №2177506 от 27.12.2001).

Качественный и количественный состав промышленных образцов мицелиальной массы и липидно-каротинового комплекса, выделенного из нее, был изучен нами на десяти промышленных образцах.

Для решения поставленной задачи разработан способ и аппарат для извлечения липидов из маслосодержащего сырья, который позволяет обеспечить мягкие условия экстракции, исключаящие изменение легко окисляющихся ве-

ществ (а. с. СССР №908787 и №916533), а также метод анализа бета-каротина в мицелиальной массе, не прошедшей стадию сушки (патент РФ №1730578).

Анализ полученных результатов показывает, что качественные показатели исследованных партий изменяются в широких пределах: содержание бета-каротина - от 21,56 до 44,73 мг/г мицелиальной массы; масличность - от 32,85 до 52,86 %, кислотное число - от 5,96 до 14,27 мг КОН, содержание фосфолипидов - от 0,82 % до 4,31 %.

3.2. Получение субстанции бета-каротина

Изучение особенностей локализации бета-каротина в клетке гриба в процессе ферментации культуры *Blakeslea trispora*, показало, что бета-каротин в клетке находится, как в растворенном, в клеточных липидах, состоянии, так и в виде кристаллов. К моменту окончания процесса ферментации массовая доля кристаллического бета-каротина составляет 85-87%, растворенного в липидной фазе 13-15%. Установлено, что концентрация бета-каротина, растворенного в липидах в 3-5 раз превышает концентрацию насыщения, при которой в растворах каротина в растительном масле начинается процесс кристаллообразования. Бета-каротин, растворенный в клеточных липидах, в дальнейшем не кристаллизуется.

Для повышения степени извлечения кристаллического бета-каротина экстракцией, разработан способ извлечения растворенного в клеточных липидах бета-каротина путем прессования мицелиальной массы при 40⁰С и давления 20 Мпа, без предварительного измельчения (патент РФ №1748446).

С целью определения экстрагируемости бета-каротина нами определены эффективные коэффициенты диффузии на образцах измельченной и неизмельченной мицелиальной массы при 90 и 100⁰ С. Результаты показали, что с повышением температуры экстракции коэффициенты диффузии бета-каротина из измельченной и неизмельченной мицелиальной массы отличаются незначи-

тельно, что свидетельствует о возможности проведения процесса экстракции без предварительного измельчения мицелиальной массы.

Для извлечения кристаллического бета-каротина из мицелиальной массы растительном маслом, были проведены эксперименты по определению оптимальных параметров экстракции с применением методов математического планирования эксперимента. Оптимальные условия получения высококонцентрированных растворов бета-каротина в растительном масле достигаются трехступенчатой противоточной экстракцией при температуре 100°C , времени экстракции на одной ступени 35 минут, соотношении растительное масло : мицелиальная масса от 1,5:1 до 2,4:1 в зависимости от содержания бета-каротина в исходной мицелиальной массе (патент РФ №1336498).

Разработан аппарат-экстрактор для системы «твердое тело-жидкость», в котором совмещены две операции: экстракция бета-каротина из мицелиальной массы и разделение твердой и жидкой фаз (патент РФ №16508901).

Бета-каротин, извлекаемый из мицелиальной массы, растворен в липидах и процесс кристаллизации его осложнен наличием в липидной системе сопутствующих веществ. Общее количество их достигает 30% и более, в том числе свободных жирных кислот до 10%, фосфолипидов до 12%, моно- и диацилглицеринов до 6%. Жирнокислотный состав на 50% представлен насыщенными кислотами, которые при 20°C имеют мажеобразную консистенцию и повышают вязкость системы.

Проведенные исследования показали, что кристаллизация бета-каротина идет параллельно с процессом осаждения на его поверхности свободных жирных кислот и фосфолипидов и нейтрального жира. Процесс кристаллизации можно разделить на два этапа: первый – массовая кристаллизация, при которой наблюдается активное понижение концентрации раствора. На этом этапе кристаллы имеют различные размеры и форму, что дает основание считать их зародышами, не завершившими свое формирование. Второй этап - перекристаллизация начинается через 48 часов, изменение концентрации раствора незначи-

тельно, происходит формирование кристаллов в направлении более стабильной структуры. Образуются кристаллы правильной ромбической формы.

Состав осадков, образующийся при кристаллизации бета-каротина следующий: нейтральный жир 55-60%; свободные жирные кислоты 19-25%; фосфолипиды 3-6%; бета-каротин кристаллический 10-20%.

Анализ полученных результатов позволил разработать способ очистки кристаллов от адсорбированных на их поверхности жировых компонентов, который заключается в обработке суспензии кристаллов бета-каротина 1-1,5 Н раствором щелочи. Количество щелочи составляет 8-12 мл на 1 г очищаемой суспензии, время обработки - 15-20 минут при кипении реакционной массы. Полученный мыльный раствор разбавляли водой, кристаллы отделяли фильтрацией, промывали водой до отрицательной реакции по фенолфталеину, затем - этанолом для удаления воды и сушили (патент РФ №1624952, патент РФ №2168913).

Для улучшения качества кристаллического бета-каротина, сокращения расхода компонентов при очистке кристаллов, увеличения производительности, разработано устройство для получения кристаллического бета-каротина из суспензии. Это устройство позволяет осуществлять в одном аппарате несколько операций: отделение кристаллов от жидкой фазы фильтрацией, омыление, промывку кристаллов (патент РФ №2088303).

Масляный экстракт бета-каротина, остающийся после отделения кристаллов также содержит в своем составе сопутствующие вещества. Для улучшения качества масляного экстракта определяли возможность применения способа экстракции в системе жидкость-жидкость этанолом для удаления сопутствующих веществ. Для этого определили коэффициенты распределения основных компонентов: бета-каротина, свободных жирных кислот и фосфолипидов в интервале температур от 20 до 60° С при соотношении фаз масляный экстракт бета-каротина : этанол от 1:1 до 1:3. Результаты экспериментов показали высокую селективность этанола по отношению к бета-каротину. Это позволило разработать способ рафинации масляного экстракта бета-каротина этанолом в сис-

теме жидкость-жидкость. Способ осуществляется при соотношении фаз масляный экстракт бета-каротина - этанол 1:2, при температуре 20-25⁰ С на первой ступени и 40-45⁰ С – на второй. Это дает возможность снизить кислотное число на 60%; массовую долю фосфолипидов на 85 %; при этом потери бета-каротина составляют 0,25 % (патент РФ №1028064).

После разделения фаз масляный экстракт удерживает до 7% этанола. Было установлено, что наличие этанола снижает вязкость рафинированного масляного экстракта бета-каротина и способствует увеличению глубины кристаллизации.

Осадок состоит преимущественно из кристаллического бета-каротина и адсорбированного на поверхности кристаллов нейтрального жира, а также некоторого количества свободных жирных кислот, которые не удастся удалить селективной рафинацией: нейтральный жир 45-50 %; свободные жирные кислоты – 5-10%; фосфолипиды – не обнаружены; бета-каротин кристаллический – 45-50% . С целью отделения кристаллов от нейтрального жира разработали способ очистки кристаллов, выделенных из рафинированных масляных экстрактов бета-каротина, основанный на свойстве этанола полностью смешиваться с липидами в точке кипения раствора. Равновесие в системе над осадком достигается через 10 минут. Кратность промывки необходимо регулировать в зависимости от состава осадка (патент РФ №1197402).

В результате проведенных исследований разработана технология промышленного производства субстанции кристаллического бета-каротина, которая включает в себя следующие стадии: прессование мицелиальной массы, экстракцию бета-каротина из мицелиальной массы растительным маслом, отделение твердой фазы, рафинацию масляного экстракта бета-каротина, кристаллизацию, отделение кристаллов, очистку, промывку и сушку кристаллов, удаление остатков растворителя из масляного экстракта бета-каротина, регенерацию растворителя.

С целью использования субстанции бета-каротина при разработке препаратов изучили кинетику растворения кристаллического бета-каротина в рас-

тительном масле. В работе были определены константы скорости растворения бета-каротина при изменении температур в интервале от 40 до 100°C. Константу скорости растворения определяли по экспериментальным зависимостям, а также вычисляли как среднее арифметическое из значений констант скоростей, рассчитанных для каждого данного момента по методике, предложенной Щукаревым (1974). Установили, что процесс растворения кристаллического бета-каротина в растительном масле – гетерогенный процесс первого порядка.

Вид растворяемых кристаллов существенно влияет на скорость растворения. Кристаллы, образующиеся на стадии массовой кристаллизации, имеют скорость растворения выше. Влияние температуры на скорость растворения кристаллов, образующихся на стадии перекристаллизации, менее выражено.

При получении препаратов бета-каротина, важно подобрать растворитель, обеспечивающий сохранность бета-каротина, в получаемых растворах. Поэтому для стабилизации бета-каротина изучали кинетические закономерности его окисления в растворах дезодорированного подсолнечного масла, в кристаллическом виде и в органическом растворителе (хлорбензоле).

Кинетику окисления бета-каротина изучали в интервале температур от 50 до 80°C в твердой фазе и от 60 до 135°C в растворах с применением инициатора азо-ди-изобутиронитрила (АИБН) и антиоксиданта ионола (4-метил,2,6-дитретбутилфенол). Полученные кинетические зависимости поглощения кислорода при автоокислении бета-каротина в растительных маслах имеют автоускоренный характер, что свидетельствует о наличии в маслах природных антиоксидантов.

Из начальных условий окисления была определена зависимость скорости окисления бета-каротина от температуры при его концентрации $1,86 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Установили, что имеет место корреляция между $\lg W_{O_2} T^{-1}$. Выявлено, что $W_{O_2}/K = 5,7 \cdot 10^2 \exp(-11400/RT)$, сек^{-1} (1). Учитывая линейную зависимость скорости окисления от концентрации бета-каротина с помощью уравнения (1), можно определить скорость окисления бета-каротина в растительном масле при

любой температуре. Аналогичные результаты были получены для бета-каротина в кристаллическом виде

Оказалось, что $W_{O_2} = 3,24 \cdot 10^4 \exp(-11400/RT)$, ммоль/л·с (2)

Температурная зависимость скорости автоокисления определена также в растворе хлорбензола. $W_{O_2}/R = 1 \cdot 10^4 \exp(-11200/RT)$, л/моль·сек⁻¹ (3)

Из уравнений (1) и (3) следует, что при одной и той же температуре бета-каротин в хлорбензоле окисляется в 25 раз быстрее, чем в растительном масле. Это объясняется более высокой вязкостью масла и наличием в нем природных антиоксидантов.

С целью изучения влияния природы растительных масел на стабильность растворенного в них бета-каротина провели эксперименты по определению устойчивости к окислению бета-каротина в маслах. Установлено, что наиболее эффективными в этом отношении являются подсолнечное высокоолеиновое и кукурузное рафинированные дезодорированные масла.

3.3. Стандартизация препаратов бета-каротина

Фармакопейная статья на производство субстанции бета-каротина разрабатывалась и утверждалась в Российской Федерации впервые. В связи с этим в выборе показателей, характеризующих качество препарата, руководствовались международным стандартом: Фармакопеей США XXIII издания. Сравнительные данные разработанной фармакопейной субстанции, проведенные ГНИИ по контролю лекарственных средств Минзлдрава РФ, приведены в таблице 1.

В разработанную Фармакопейную статью включены следующие показатели: описание, растворимость, подлинность, поглощающие примеси, температура плавления, потеря в массе при высушивании, сульфатная зола, тяжелые металлы, микробиологическая чистота и родственные примеси. Для определения родственных примесей нами разработан метод с использованием ВЭЖХ. Обнаружено три примеси, одну из которых идентифицировать не удалось, так как пятно быстро исчезало. Анализ полученных спектров поглощения показал

Таблица 1

Сравнение показателей качества бета-каротина по ФС и Фармакопее США
XXIII изд., 1995 г.

№ № п/п	Показате- ли НД	Проект ФС	Фармакопея США, XXIII изд. 1995 г.
1	Описание	Фиолетовые с металлическим блеском кристаллы. Без запаха. Чувствительны к действию кислорода и света.	Кристаллы или кристаллический порошок красного, красно-коричневого или фиолетово-коричневого цвета
2	Растворимость	Трудно растворим в хлороформе, практически не растворим в 96% спирте и воде	Не растворим в воде, кислотах и щелочах, растворим в сероуглероде, бензоле и хлороформе, трудно растворим в эфире, гексане, растительных маслах, практически не растворим в метаноле и этаноле
3	Подлинность	Отношение D 465/D 493 нм 1,14-1,18 (хлороформ)	Отношение D 455 /D 494 нм 1,14-1,18 (циклогексан) Отношение D 455/D 340 не менее 1,5 (циклогексан)
4	Чистота	Метод ВЭЖХ, не более 4,0 %	-
5	Температура плавления	176 – 182°C	176 – 182°C
6	Потеря в массе при высушивании	Не более 0,5 % Сушат в вакуум-сушильном шкафу при температуре 50°C, 3 часа	Не более 0,2 % Сушат в вакуум-сушильном шкафу 4 часа при температуре 40°C из навески 0,2 г
7	Сульфатная зола	Не более 0,2 % из навески 1г	Не более 0,2% из навески 2 г
8	Тяжелые металлы	Не более 0,001 %	Не более 0,001 %
9	Количественное определение	Определение абсорбции при 465 нм (хлороформ) Удельный показатель поглощения 2396 препарат содержит C ₄₀ H ₅₀ не менее 96,0% и не более 101,0 %	Определение абсорбции при 455 нм (циклогексан) Удельный показатель поглощения 2500. Препарат содержит C ₄₀ H ₅₀ не менее 96,0 % и не более 101,0%

присутствие в растворе бета-каротина двух примесей характерных для каротиноидов, предположительно ксантофиллов, которые имели максимумы поглощения при длинах волн 450 и 475 нм, но разную хроматографическую подвижность, что подтверждает природный характер препарата.

Субстанция бета-каротина представляет собой красно-фиолетовые кристаллы с металлическим блеском трудно растворимые в хлороформе и нерастворимые в 96% спирте и воде. Подлинность препарата подтверждается тах спектров поглощения, которые в хлороформе составляют 464 ± 2 и 492 ± 2 нм.

Температура плавления препарата находится в интервале от 176 до 182⁰С. Содержание суммы родственных примесей не должно превышать 4,0%, а массовая доля бета-каротина должна составлять не менее 96,0%. Потеря в массе при высушивании не должна превышать 0,05%, сульфатная зола не более 0,2%, а содержание тяжелых металлов не более 0,001%. Препарат должен удовлетворять требованиям к не стерильным лекарственным средствам. Срок годности препарата установлен 2 года при условии хранения в защищенном от света месте и температуре не выше +5⁰С.

На основе фармакопейной субстанции бета-каротина было разработано лекарственное средство каролин медицинского и ветеринарного качества (патент РФ №2118528 от 10.09.1998 г.).

Препарат представляет собой раствор бета-каротина в растительном масле. В состав препарата входит бета-каротин (ФС 42-3867-99) в количестве 0,1% и масло подсолнечное рафинированное дезодорированное по ГОСТ 1129 или масло кукурузное рафинированное дезодорированное по ГОСТ 8808 до 100%.

В Фармакопейную статью включены следующие разделы: описание, подлинность, плотность, показатель преломления, кислотное число, перекисное число, микробиологическая чистота, количественное определение, упаковка, маркировка, транспортирование, хранение, срок годности, фармакологическая группа.

Препарат представляет собой прозрачную маслянистую жидкость оранжево-красного цвета. Подлинность препарата определяли по спектру поглоще-

ния в области от 300 до 500 нм, при этом спектр должен иметь те же максимумы, что и спектр рабочего стандартного образца бета-каротина (РСО), приготовленного из субстанции, использованной при производстве препарата данной серии.

Вторым способом определения подлинности является разработанный нами метод тонкослойной хроматографии для идентификации бета-каротина: на хроматограмме анализируемого образца должно обнаружиться пятно желтого цвета с $R_f = 0,5$.

Плотность препарата находится в интервале 0,917- 0,930, показатель преломления – 1,474-1,480, кислотное число не более 0,4 мг КОН на 1 г жира, перекисное число не более $10 \frac{1}{2}$ О ммоль/кг, содержание бета-каротина в препарате 0,09-0,11 %. Результаты физико-химических анализов, полученные при хранении препарата, упакованного в соответствии с требованиями, хранившегося в защищенном от света месте при температуре не выше $+10^{\circ}\text{C}$, позволили установить срок годности препарата 2 года.

Ветеринарный препарат каролин представляет собой стерильный раствор субстанции бета-каротина в растительном масле. Массовая доля бета-каротина, в отличие от лекарственного препарата, составляет не менее 0,18%. Это маслянистая жидкость темно-красного цвета без запаха со вкусом обезличенного масла, кислотное число не более 0,4 мг КОН/ 1 г жира; перекисное число не более $10 \frac{1}{2}$ О ммоль/кг. Препарат должен быть стерилен и безвреден в тест дозе 0,1 мл на одну мышь.

Изучение стабильности препарата в течение трех лет позволило установить срок хранения препарата 2 года, при условии хранения в защищенном от света месте при температуре не выше $+10^{\circ}\text{C}$.

3.4. Оценка общетоксических свойств каролина

Изучение острой токсичности каролина проводили на животных и птице. В эксперименте было использовано по 10 нелинейных мышей массой 18-20 г и

крыс массой 150-160 г, по 8 цыплят массой 400-470 г, по 8 поросят массой 7,1-7,8 кг.

В течение всего срока наблюдения гибели животных не отмечалось. Никаких изменений в клиническом состоянии животных не наблюдалось. Общее состояние животных опытной и контрольной групп было удовлетворительным. Рефлексы были сохранены. Животные были подвижны, нарушений функциональной активности органов пищеварения и мочеотделения не наблюдалось.

Изучение субхронической токсичности препарата каролин проводили на 36 нелинейных крысах, массой 144-160 г. Ежедневно, в течение эксперимента проводилось наблюдение за общим состоянием животных, их выживаемостью.

Проведенные исследования показали, что препарат каролин хорошо переносится животными. Визуальное наблюдение в течение всего эксперимента не выявило каких-либо изменений в поведении опытных животных, получавших каролин в дозе 3,0 мл/кг в сравнении с животными контрольной группы. Более того, внешне животные выглядели лучше, чем в контрольной группе: они имели более гладкую и блестящую шерсть. У животных, получавших препарат в дозе 15,0 мл/кг, отмечался неопрятный вид (взъерошенная шерсть) в начале введения. Впоследствии животные этой группы не отличались от контрольных животных. Гибели не наблюдалось ни в одной из групп. Анализ динамики массы тела крыс показал положительный прирост ее, как в контрольной, так и в опытной группе. Достоверных различий в приросте не отмечено.

Морфологические и биохимические исследования не выявили различий в показателях периферической крови в опытных и контрольной группах животных. Однако следует отметить наличие тенденции к снижению глюкозы и мочевины в крови крыс, получавших каролин в дозе 15,0 мл/кг.

Исследование двигательной активности группы крыс, получавших препарат в дозе 3 мл/кг, выявило статистически достоверное снижение горизонтальной активности в сравнении с контрольной группой. Показатели двигательной активности группы крыс, получавших препарат в дозе 15 мг/мл, не отличались от контрольной группы. Артериальное давление и пульс в обеих опытных

группах оставались на уровне контроля. Через 1 месяц после окончания введения каролина двигательная активность опытных животных восстановилась.

Патоморфологические исследования состояния слизистой кишечника, не показали каких-либо различий в опытных и контрольной группах. Расположение внутренних органов было типичным, в плевральной и брюшной полости жидкости не было. Просвет трахеи и бронхов свободен. Ткань легких розового цвета, воздушная.

Таким образом, проведенное исследование общетоксических свойств лекарственного средства каролин при однократном и повторном в течение месяца введении в дозах, превышающих терапевтические в 6 и 30 раз, показало хорошую переносимость препарата экспериментальными животными. Ни одна из изучаемых доз (3 и 15 мл/кг) не вызвала достоверных изменений исследуемых показателей опытных животных в сравнении с контрольными.

Опыты по изучению субхронической токсичности каролина проводили также на телятах и поросятах.

В опыте использовали 20 телят 30-дневного возраста, которые в течение 60 дней получали по 35 мл каролина.

Показано, что каролин введенный в рацион кормления, не оказывал отрицательного влияния на организм опытных телят. Состояние животных было удовлетворительным. Они адекватно реагировали на внешние раздражители, хорошо развивались. В опыте установлено, что суточный прирост массы телят в опытной группе превышал аналогичный показатель в контрольной группе на 10,2%. Физико-химические показатели мочи и фекалий оставались в пределах физиологической нормы. Биохимическими исследованиями в моче не обнаружено белка, альбумоз, желчных пигментов, углеводов.

Содержание эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина, общего белка и белковых фракций, каротина и витамина А, общих липидов в опытных и контрольных группах также существенно не отличалось.

Назначение телятам каролина способствовало увеличению содержания эритроцитов со слабым повышением гемоглобина.

Препарат достоверно повышал уровень общего белка на 17,5%, каротина в 2 раза и витамина А в 1,8 раза, а также наблюдалась тенденция к увеличению гамма-глобулиновой фракции сыворотки крови, снижению альбуминовой и повышению уровня общих липидов. Остальные показатели не претерпевали существенных изменений и не отличались от контрольных.

Таким образом, комплексные исследования, проведенные на опытных и сельскохозяйственных животных, показали, что кароллин не обладает токсическим действием в дозах, во много раз превышающих терапевтические.

Исследование аллергенных и иммунотоксичных свойств кароллина изучали на морских свинках массой 300-350 г, мышах линии СВА: С57В1: (СВАхС57В1) F1, массой 18-20 г, белых беспородных крысах массой 200-250 г.

Аллергенные свойства препарата изучали методом активной системной анафилаксии, реакции гиперчувствительности замедленного типа к препарату, реакции иммунных комплексов, не прямой реакции дегрануляции тучных клеток крыс. Влияние бета-каротина на иммунную систему оценивалось по функциональной активности макрофагов, по реакции бласттрансформации.

Различные способы введения препарата при изучении аллергенных свойств методом активной системной анафилаксии практически не вызывали сенсibilизации организма экспериментальных животных. Многократное подкожное или внутримышечное введение препарата не приводило к развитию анафилактической реакции в ответ на введение разрешающей дозы препарата. Не было зарегистрировано реакции со смертельным исходом. Слабые аллергические реакции, отмеченные у части экспериментальных животных, свидетельствуют о низкой сенсibilизирующей активности бета-каротина.

Дополнительные подтверждения отсутствия аллергенной активности бета-каротина были получены в результате исследования способности препарата, индуцировать гиперчувствительность замедленного типа. Показано, что повторное введение препарата практически не сопровождалось местной воспалительной реакцией, регистрируемой через 8 и 24 часа после введения разре-

шающей дозы тест-препарата. Статистически значимые различия между опытом и контролем не были обнаружены.

Исследования аллергенной активности бета-каротина были проведены и в реакции непрямой деструкции тучных клеток (РДТК). Результаты исследования также не выявили сенсибилизации организма животных. Статистические различия между опытом и контролем не были обнаружены ни на один из выбранных сроков наблюдения.

Для оценки действия бета-каротина на иммунную систему было исследовано митостатическое и лимфотоксическое действие в отношении эндогенных стволовых кроветворных клеток (митостатическое действие) и влияние препарата на аллогенные лимфоциты (лимфотоксическое действие) в реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). Исходя из полученных результатов, можно заключить, что препарат не подавлял образование колониеобразующих клеток (КОЕ), тем самым не оказывал митостатического действия. Лимфотоксическое действие препарата также не было выявлено.

Исследование влияния бета-каротина на макрофаги проводили на мышцах линии (СВАхС57В1)F1. Показано, что фагоцитарная активность в опытной и контрольной группах практически не отличалась (соответственно 100 и $96,2 \pm 2,1\%$, $P > 0,05$). Судя по показателю фагоцитарный индекс (ФИ), функциональная активность макрофагов в обеих группах также не отличалась ($\text{ФИ} = 5,1 \pm 0,7$ и $4,9 \pm 0,4$ соответственно).

Влияние препарата на иммунореактивность организма экспериментальных животных оценивали по показателям интенсивности пролиферативного ответа спленоцитов мышей (СВАхС57В1)F1 конканавалину А. Животным вводили бета-каротин (0,05% раствор) внутримышечно. Реакцию бласттрансформации ставили через три дня после последней инъекции препарата.

Установлено, что препарат не оказывал существенного влияния на пролиферацию иммунокомпетентных клеток.

Таким образом, в эксперименте не выявлено: аллергизирующего действия бета-каротина, влияния его на фагоцитарную активность макрофагов, на мито-

гениндуцированную пролиферацию лимфоцитов; митостатического и лимфотоксического действия.

Влияние каролина на печень, изучали на поросятах 2-х месячного возраста. Опытные животные ежедневно с кормом в течение 30 дней получали каролин в количестве 15 мл.

Результаты проведенных исследований не выявили нарушений функций печени под воздействием каролина, однако, незначительно, в пределах нормы, повышался уровень белка. Количественное содержание билирубина, ферментов АЛТ и АСТ у поросят опытной и контрольной групп не различалось.

Местнораздражающее действие каролина изучали методом накожных аппликаций на морских свинках и кроликах. В течение 5 дней эксперимента препарат не вызывал у опытных животных никаких изменений. Таким образом, каролин не проявлял местнораздражающего действия.

Ветеринарно-санитарная оценка мяса при применении каролина была получена на 10 поросятах-отъемышах, которым препарат назначали в количестве 15 мл на животное в течение 30 дней. Ветеринарно-санитарное исследование показало, что применение каролина при откорме не влияет отрицательно на качество мяса поросят. Убойный вес одной туши в опытной группе составил в среднем 14,9 кг, а в контрольной – 11,8 кг. Мясо было хорошо обескровлено, без гемостазов и кровоизлияний. В лимфоузлах патологических изменений не обнаружено. Цвет мяса бледно-розовый, поверхность разреза слегка влажная, не липкая, мышечный слой прозрачный. Запах мяса приятный, специфический, консистенция мышц упругая. Жир белый, местами бледно-розового цвета, мягкий, эластичный, без запаха. Комиссионная дегустация мяса показала, что запах бульона всех проб, был ароматным, приятным и специфическим.

3.5. Разработка показаний к применению и эффективность каролина в медицине

Исследовали эффективность применения каролина при лечении женщин больных эндометриозом. Обследовались женщины, которые, находясь в ста-

ционарном гинекологическом отделении, получали в течение 14 дней по 30-45 мл препарата каролин ежедневно. Полученные результаты биохимических исследований показали, что у больных эндометриозом развивается гиперхолестеринемия за счет повышения холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и гипертриацилглицеринемия. 14-дневное применение препарата каролин обеспечило нормализацию содержания общего холестерина, холестерина ЛПНП и малонового диальдегида. Препарат на 63,6% повысил антиокислительную активность сыворотки крови, подняв ее с 48,7% у больных женщин до 79,7% в сравнении с контролем после лечения. Кроме этого, получены следующие положительные сдвиги в области значений, характерных для здоровых женщин: уменьшение холестерина ЛПОНП на 17%, триацилглицеринов на 15%, белково-липидного индекса липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) на 22%. Препарат не оказал влияния на содержание холестерина ЛПВП и резко уменьшил количество липидов в ЛПНП (патент РФ № 2108757 от 20.04.98 г.).

Изучили возможность применения каролина в кардиологии.

Курсовое применение внутрисосудистого лазерного облучения крови гелий-неоновым лазером (ВЛОК ГНЛ) у больных прогрессирующей стенокардией не оказывало влияния на основные показатели липидтранспортной системы (ЛТС). В то же время установлено, что ВЛОК ГНЛ обеспечивает уменьшение уровня малонового диальдегида (МДА) в плазме крови на 19,8 % и повышает антиокислительную активность плазмы крови на 23,9 %. Поскольку положительное действие ВЛОК ГНЛ на два параметра перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме крови больных сопряжены с явлением деспирализации ДНК ядер лимфоцитов, была предпринята попытка нивелирования отрицательного эффекта ГНЛ и усиления его позитивного действия путем параллельного применения препарата каролин. Оказалось, что такая комбинация лечения сопровождалась более благоприятными сдвигами в параметрах ЛТС и ПОЛ: выявлена тенденция к увеличению уровня холестерина ЛПВП; обнаружено уменьшение содержания МДА в плазме крови на 19,5% и параллельное повышение

АОА плазмы крови на 25,7%, уменьшению накопления МДА в эритроцитах на 26,9% и повышению перекисной устойчивости эритроцитов на 17,8%.

В результате предложен способ лечения больных прогрессирующей стенокардией ВЛОК ГНЛ в сочетании с каролином, предназначенный для более быстрого достижения стабилизации заболевания (на 4 суток). При этом наблюдается увеличение числа больных с тенденцией нормализации показателей ЭКГ (на 13,2%) и улучшение функции сердца (проба КИН) на 30%. Положительная клиническая динамика сопряжена с нормализацией показателей ПОЛ, повышением АОА и уровня холестерина ЛПВП, т.е. показателей, играющих центральную роль в патогенезе заболевания.

Изучили эффективность применения каролина при лечении инфильтративной форме туберкулеза легких, с целью снятия гепатотоксического действия химиотерапевтических препаратов и снижения процессов свободно-радикального окисления липидов.

Введение каролина в схему лечения оказывает выраженное гепатопротекторное действие (нормализация состава ЛПВП, уменьшение активности аминотрансфераз, щелочной фосфатазы, гаммаглутаминилтрансферазы). Каролин не изменял основные показатели метаболизма: содержание глюкозы, билирубина, креатинина, мочевины, калия и белковых фракций в крови.

Проведенные исследования показали, что каролин может применяться в лечении больных инфильтративной формой туберкулеза легких. При этом ослабляется побочное гепатотоксическое действие противотуберкулезных препаратов.

3.7. Разработка показаний к применению и эффективность каролина в ветеринарии

В первой серии опытов определение профилактического влияния каролина на воспроизводительную функцию изучено на 152 коровах (в сухостойном периоде) за 30 дней до отела. Из них были сформированы две группы коров-аналогов по 76 голов: 1 – опытная, 2 – контрольная. Животным опытной

группы подкожно вводили каролин в дозе 10 мл на голову 3 раза, с интервалом 7 дней, до отела и 2 раза после отела. Коровам контрольной группы препарат не вводили.

Результаты исследований показали, что у коров опытной группы, получавших каролин, случаев задержания последа было на 14,9% меньше, чем в контрольной группе, на 22,4 % меньше коров заболело послеродовым эндометритом, на 8,8 % меньше коров с расстройством функции яичников. Сервис-период оказался на 20 дней короче у животных опытной группы и составил $95 \pm 1,7$ дня, у контрольных животных - $115 \pm 2,8$ дня. Индекс осеменения у коров опытной группы был на 1,0 ниже, чем в контрольной группе. Биохимические исследования сыворотки крови показали, что препарат каролин оказывает положительное влияние на физиологические процессы в организме животных.

Во второй серии опытов по профилактике послеродовых заболеваний установлено, что у коров опытной группы было на 12,5% меньше случаев задержаний последа, на 15,0% меньше животных заболело острым послеродовым эндометритом, на 10% меньше наблюдалось коров с гипофункциональным состоянием яичников, на 7,5% меньше коров с персистентным желтым телом. Индекс осеменения опытных животных был на 0,7 ниже, на 29 дней короче сервис-период по сравнению с животными контрольной группы.

У животных опытной группы (9 голов) и контрольной (9 голов) были взяты пробы маточного секрета на 4, 7, 15 и 21 день после родов для лабораторных исследований. В маточном секрете определяли титр иммуноглобулинов А, М, количество лизоцима и бактерицидную активность.

У коров опытной группы достоверно повышались показатели местной иммунной реактивности матки.

Результаты экспериментов были воспроизведены в широком научно-производственном опыте на поголовье в 3658 коров.

Показано, что введение препарата каролин коровам в сухостойный и ранний послеотельный период оказывает положительное влияние на воспроизводительную систему крупного рогатого скота. В опытной группе коров в 1,9

раза меньше отмечалось задержаний последа, на 13,4 % животных меньше заболело эндометритом, на 10,1 % меньше отмечалось гипофункции яичников, на 9,4 % - персистентных желтых тел, на 13,0 дней короче сервис-период и на 0,5 – меньше индекс оплодотворения в сравнении с контрольной группой (таблица 2).

Таким образом, препарат каролин может быть рекомендован в качестве средства профилактики послеродовых осложнений у коров.

Специальная серия опытов посвящена изучению влияния каролина на беременных свиноматок, а через их организм – на новорожденных поросят.

Исследования показали, что после опороса у 2-х свиноматок контрольной группы отмечен синдром метрит-мастит-агалактия, в опытной группе животные не болели. Поросята, полученные от свиноматок в опытной группе, росли интенсивнее: масса их, в возрасте 21 день, была на 5,3 % выше, чем в контрольной группе, через месяц этот показатель составил 2,17 %. В опытной группе выше была сохранность поросят. Ускорение роста и повышение сохранности поросят объясняется благоприятными изменениями молочности подсосных свиноматок, получавших каролин.

Проведены опыты по изучению действия каролина на поросят-отъемышей: их рост, продуктивность и биоконверсию корма при разных способах введения в организм. Две группы поросят получали ежедневно в течение 2 месяцев с кормом каролин из расчета 10 и 5 мл/гол. Одна группа поросят получала препарат в дозе 5 мл/гол путем внутримышечной инъекции один раз в 5 дней.

Результаты исследований показали, что добавление в корм каролина поросятам 1-2 групп способствовало повышению их сохранности на 7,5% и 5% в сравнении с контрольной группой. Прирост живой массы увеличился на 5,7% и на 5,1%. При внутримышечной инъекции сохранность поросят была выше на 7,5% в сравнении с контрольной группой, но не оказала стимулирующего влияния на прирост массы тела.

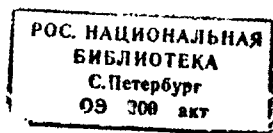


Таблица 2

Действие препарата каролин на предупреждение заболеваний
родополового аппарата у коров

Серия опы-тов	Показатели	Опытная группа		Контрольная группа	
		Кол-во	%	Кол-во	%
1	Кол-во коров в опыте	76	100	76	100
	Задержание последа	5	6,6	16	21,5
	Послеродовой эндометрит	15	19,7	32	42,1
	Гипофункция яичников	11	14,5	20	26,3
	Персистентное желтое тело	4	5,3	12	15,8
	Продолжительность сервис-периода (дней)	95±1,7		115±2,8	
	Индекс осеменения	1,8±0,1		2,8±0,2	
2	Кол-во коров в опыте	80	100	80	100
	Задержание последа	4	5,0	14	17,5
	Послеродовой эндометрит	11	13,8	23	28,8
	Гипофункция яичников	10	12,5	18	22,5
	Персистентное желтое тело	3	3,8	9	11,3
	Продолжительность сервис-периода (дней)	87±2,6		116±3,2	
	Индекс осеменения	1,6±0,04		2,3±0,3	
Производственный опыт		Опыт (1829 коров)		Контроль (1829 коров)	
		Кол-во	%	Кол-во	%
Задержание последа		162	8,8	315	17,2
Послеродовой эндометрит		397	21,7	643	35,1
Гипофункция яичников		437	23,8	621	33,9
Персистентное желтое тело		161	8,8	333	18,2
Продолжительность сервис-периода (дней)		95±2,1		108,5±2,5	
Индекс осеменения		2,1±0,05		2,6±0,22	

3.8. Разработка показаний к применению и эффективность каролина в животноводстве и птицеводстве

Применение каролина при гипотрофии поросят показало его активное влияние на рост и развитие поросят-гипотрофиков. Под влиянием каролина произошло улучшение общего состояния поросят. Постепенно сгладились, ослабели и исчезли признаки гипотрофии. У опытных поросят, в сравнении с контрольными, отмечен высокий темп прироста живой массы. Каролин заметно ускорил время достижения животными убойных кондиций. У животных опытной группы оно составило 225 дней, у контрольной – 252 дня (у нормотрофиков – 221 день). У опытных животных, подвергнутых лечению каролином, увеличилось количество гемоглобина и эритроцитов, общего белка и гамма-глобулинов в сыворотке крови.

Опыты по применению каролина в птицеводстве проводили на курах-несушках кросса «Ломани-Браун». Курам опытной группы в течение 40 дней давали каролин из расчета 2 л на тонну комбикорма.

Установлено, что при добавлении каролина в рацион кур-несушек средняя масса яйца увеличилась на 1,3%, повысилось содержание каротиноидов в желтке яиц на 10,15%, витамина А – на 8,52%, что оказало положительное влияние на результаты инкубации, выводимость и сохранность цыплят. В опытной группе, в сравнении с контрольной, выводимость цыплят повысилась на 2,47%, масса суточных цыплят увеличилась на 1,55%, сохранность возросла на 1,7%. Введение каролина в рацион кур-несушек усилило пигментацию желтка яиц на 2 балла (по цветной шкале ВНИИТИП).

Скармливание каролина мясным курам-несушкам в той же дозе, ведет к благоприятным изменениям химического состава и биологических свойств яиц. В желтке яиц, снесенных опытными курами, больше каротиноидов (на 13,4%) и витамина А (на 2,1 %). При этом выводимость цыплят повысилась (на 5,5 %) и их сохранность (на 2,7 %).

Каролин оказывает активное влияние на рост и развитие цыплят. В сравнении с контрольной, масса тела цыплят первой опытной группы была на 3,59% больше, второй – на 5,6%. Увеличение каротина в печени цыплят первой опытной группы составило 134,2%, второй – 163,0%, витамина А – соответственно 19,5% и 40,1%.

Изучение терапевтической эффективности каролина при гиповитаминозе А показало, что у птиц, получавших каролин, в среднем на 20-е сутки исчезали клинические признаки гиповитаминоза, тогда как в контрольной группе симптомокомплекс заболевания становился более выраженным. У птиц, получавших каролин, процент сохранности был выше (на 20 сутки на 5,45 %, на 40-е сутки – на 15,46 %) в сравнении с контролем. В опытной группе, в сравнении с контрольной, была более высокая интенсивность яйцекладки (на 20-е сутки – на 19,97%, на 40-е сутки – на 21,19%).

Скармливание каролина оказало положительное влияние на процессы накопления витаминов в печени кур. Увеличилось содержание каротина (на 20-е сутки в 6,57 раз, на 40-е сутки – в 30,57 раз), витамина А (на 20-е сутки в 3,67 раза, на 40-е сутки в 3,9 раза), витамина Е (на 20-е сутки в 1,98 раз, на 40-е сутки – в 2,87 раз). Эти показатели у птиц контрольной группы, находились за нижней физиологической границей.

При добавлении каролина в рацион кур-несушек увеличилось содержание каротиноидов, витаминов А и Е в желтке яиц (на 20-е сутки – в 2,94 раза, на 40-е сутки в 3,26 раза), витамина А (на 20-е сутки – в 1,97 раза, на 40-е сутки – в 2,97 раз), витамина Е (на 20-е сутки в 1,3 раза, на 40-е сутки – в 1,53 раза). В контрольной группе прослеживается тенденция к незначительному снижению этих показателей.

В группе птиц, получавших каролин, уже на 20-е сутки содержание каротина, витамина А, общего белка и холестерина нормализовалось. А на 40-е сутки эксперимента уровень каротина достоверно повысился в 3,8 раз; витамина А – в 8,6 раз; общего белка – в 1,6 раза, холестерина – в 2,2 раза. Эти показатели у птиц контрольной группы оставались ниже нормы.

Таким образом, проведенные исследования показали, что каролин обладает выраженным профилактическим и терапевтическим эффектами.

5. ВЫВОДЫ

1. Для производства мицелиальной массы, содержащей до 4,5% бета-каротина, получена новая высокоэффективная пара штаммов КР 74⁺ и КР 86⁻ культуры гриба *Blakeslea trispora*, способная утилизировать питательную среду, состоящую из отходов масложировой, крахмалопаточной промышленности и производства бета-каротина.

2. Установлено, что бета-каротин накапливается в клетке гриба в процессе ферментации в виде кристаллов (85-87%) и в растворе клеточных липидов (13-15%). Для извлечения бета-каротина, растворенного в клеточных липидах, разработан способ прессования мицелиальной массы при температуре 40⁰С и давлении 20 Мпа. Для извлечения кристаллического бета-каротина разработаны способ и аппарат для экстракции его растительным маслом, противотоком, в три ступени, при температуре 100 ⁰С, времени экстракции на одной ступени – 35 минут, соотношении растительное масло: мицелиальная масса - (в зависимости от исходной активности) от 1,5:1 до 2,4:1.

3. Установлено, что кристаллизация бета-каротина идет параллельно с процессом осаждения на его поверхности сопутствующих веществ и нейтрального жира. На основе этих данных разработан способ и устройство для очистки кристаллов бета-каротина путем омыления жировых компонентов 1-1,5% Н раствором щелочи при температуре кипения смеси.

Для улучшения качества масляных экстрактов бета-каротина, остающихся после отделения кристаллов, разработан способ очистки их от сопутствующих веществ противоточной двухступенчатой экстракцией этанолом в соотношении масляный экстракт бета-каротина : этанол 1:2 и температуре процесса на первой ступени – 20-25 ⁰С, на второй - 45-50 ⁰С.

4. Разработана технология производства и стандартизировано качество новой отечественной субстанции для производства лекарственных средств: бе-

та-каротин. Содержание действующего вещества в ней составляет не менее 96%. Контроль качественных характеристик препарата осуществляется в соответствии с разработанными методами и определяется описанием, растворимостью, подлинностью, родственными примесями, поглощающими примесями, температурой плавления, потерей в массе при высушивании, сульфатной золой, тяжелыми металлами, микробиологической чистотой.

5. Каролин медицинского и ветеринарного качества являются новыми отечественными препаратами природного происхождения. Содержание бета-каротина в них составляет 0,1% и 0,18% соответственно. Контроль качественных показателей осуществляется в соответствии с разработанными методами и определяется по описанию, подлинности, плотности, показателю преломления, кислотному числу, перекисному числу, микробиологической чистоте.

6. Проведенное исследование общетоксических свойств каролина при однократном и длительном, в течение одного-трех месяцев применении в дозах, превышающих терапевтические в 6 и 30 раз, не вызвало достоверных изменений исследуемых показателей опытных животных в сравнении с контрольными. Изучение аллергенных и иммунотоксичных свойств каролина различными методами показало, что препарат, при многократном местном и парентеральном введении, не оказывает алергизирующего действия и не проявляет иммунотоксических свойств. Каролин не оказывает вредного местного действия, не изменяет вкусовых и других качеств мяса.

7. Фармакодинамика каролина характеризуется активизацией основных видов обмена веществ, в том числе белкового — за счет повышения уровня общего белка на 7,2-33,1% и его фракций, витаминного — за счет повышения уровней витаминов А, Е и В₂ и каротина. Он повышает общую неспецифическую резистентность организма животных за счет повышения бактерицидной и лизоцимной активности, увеличения γ -глобулиновой фракции сыворотки крови.

8. Фармакокинетика каролина характеризуется увеличением содержания витамина А (на 14,2-88%) и каротина (2-3,3 раза) в сыворотке крови, в печени – витамина А (на 10,4-63%) и каротина на (19,5-41%).

9. Каролин оказался эффективным в лечении заболеваний, связанных с усилением свободнорадикальных реакций:

- при лечении эндометриоза применение препарата обеспечило нормализацию общего холестерина, холестерина ЛПНП и МДА, уменьшило содержание холестерина ЛПОНП на 17%, триацилглицеринов на 15%, белково-липидного индекса ЛПВП на 22%. Препарат на 63,6% повысил АОА сыворотки крови, в сравнении с контролем после лечения;

- при лечении больных прогрессирующей стенокардией, применение каролина в сочетании с ВЛОК ГНЛ, привело к уменьшению содержания МДА в плазме крови на 19,5%, повышению АОА на 25,7%, уменьшению накопления МДА в эритроцитах на 26,9% и повышению перекисной устойчивости эритроцитов на 17,8%.

- применение каролина при лечении больных инфильтративной формой туберкулеза ослабляет побочное гепатотоксическое действие противотуберкулезных препаратов, оказывает выраженное гепатопротекторное действие.

10. Ветеринарный каролин эффективно предотвращает развитие гиповитаминоза А у поросят, телят, кур-несушек и цыплят. У животных и птиц повышается содержание каротина и витамина А в сыворотке крови.

Каролин показан при послеродовых осложнениях у крупного рогатого скота и свиней:

- под влиянием препарата, введенного внутримышечно 2-3 раза до и после отела с интервалом 7-10 дней, уменьшается заболеваемость коров задержанием последа (на 10-14,5%), послеродовым эндометритом (10-22,4%), гипофункцией яичников (на 8,8 – 10,1%).

- препарат предупреждает заболевание свиноматок синдромом метрит-мастит-агалактия. Поросята, рожденные этими матками, растут интенсивнее, чем в контрольной группе (на 2,17-5%), их сохранность выше на 1,29-2,04%.

Каролин способствует лучшему росту, развитию животных и птиц, повышению их сохранности и продуктивности:

- внутреннее применение каролина благотворно влияет на сохранность поросят-отъемышей (выше на 7,5%), прирост живой массы возрастает на 2,05-5,7%;
- каролин в составе комбикормов активизирует прирост живой массы на 3-59%-5,6% и повышает сохранность цыплят на 2,01-3,69%.

Применение каролина способствует улучшению качества мясной и яичной продукции кур-несушек: масса яйца увеличивается на 1,3% за счет белка и желтка, содержание бета-каротина на (12,6-13,4%), витамина А (на 8,5%) в желтке. Повысилась выводимость (на 2,47%) и сохранность (на 1,7%) суточных цыплят.

11. Материалы по фармако-токсикологической оценке и лечебно-профилактической эффективности каролина медицинского и ветеринарного качества были рассмотрены и рекомендованы Департаментом Государственного контроля качества, эффективности и безопасности лекарственных средств Минздрава РФ и Советом по ветеринарным препаратам Департамента ветеринарии РФ к применению в медицинской и ветеринарной практике.

На все препараты разработана и утверждена в установленном порядке нормативно-техническая документация. Их производство налажено в производственных условиях ЗАО «Роскарфарм» (г. Краснодар), что позволило внедрить их в медицинскую и ветеринарную практику ряда регионов РФ.

6. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического применения каролина в качестве лечебно-профилактического средства в медицине рекомендуется назначать каролин – при состояниях, характеризующихся усилением свободных реакций (воздействие малых доз радиации, рентгенологическое обследование, лучевая и химио-

терапия при опухолевых заболеваниях, лазерная терапия, контакт с ядохимикатами, иммунодефицитные состояния).

В качестве лечебного средства препарат применяют в комплексной терапии заболеваний, связанных с нарушением регенерации эпителия (язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, эрозивного гастрита, дуоденита, гепатита, холецистита, неспецифического язвенного колита, дисбактериоза), острых респираторных заболеваний, хронических бронхолегочных заболеваний, гинекологических заболеваний, поражений и заболеваний кожи (раны, ожоги, отморожения трофические язвы, кератозы, псориазы и другие дерматозы).

Результаты исследований нашли отражения в документах, утвержденных Департаментом Государственного контроля качества, эффективности и безопасности лекарственных средств и медицинской техники: ФС 42-3867-99 «Бета-каротин», ФС 42-3868-99 «Каролин»; Фармакологическим государственным комитетом: Инструкция по применению каролина, регистрационный номер 95/292/6.

Для практического применения каролина в ветеринарии в качестве лечебно-профилактического средства, рекомендуется назначать каролин для нормализации обмена веществ, профилактики задержаний последа, послеродовых эндометритов и нарушений воспроизводительной функции у коров, повышения молочности свиноматок и сохранности поросят, улучшения качества яиц и сохранности цыплят.

Результаты исследований нашли отражение в документах, утвержденных Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства Российской Федерации: каролин – Технические условия №9141-003-41341380-01; Наставление по применению препарата каролин в ветеринарии, регистрационный номер: ПВР-2-4.0/00541. от 3.10.2000 г.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Фракционный состав фосфатидов, выделенный из липидов низших грибов //Труды /ВНИИЖ. – Ленинград. - 1980. – С. 104-107 (в соавторстве с Казаряном Р.В.).

2. Способ извлечения липидов из маслосодержащего материала. А.с. СССР №908787, 1981 г. (в соавторстве с Арутюняном Н.С., Казаряном Р.В., Овчаренко В.Е., Ветровым П.П., Мхитарьянц Л.А.).

3. Аппарат для извлечения липидов. А.с. СССР №916533, 1981 г. (в соавторстве с Арутюняном Н.С., Казаряном Р.В., Овчаренко В.Е., Ветровым П.П., Мхитарьянц Л.А.).

4. Краситель для пищевых продуктов. Патент РФ №1028063, 1982 г. (в соавторстве с Казаряном Р.В., Арутюняном Н.С., Ивакиным А.И.).

5. Способ получения масляного препарата бета-каротина. Патент РФ №1028064, 1993 г. (в соавторстве с Казаряном Р.В., Арутюняном Н.С., Ивакиным А.И.).

6. Способ получения кристаллического бета-каротина. Патент РФ №1197402, 1993 г. (в соавторстве с Казаряном Р.В., Арутюняном Н.С., Ивакиным А.Ф.).

7. Кинетика окисления бета-каротина //Изв. ВУЗов СССР. Пищевая технология. – 1984. - №6. – С. 69-71 (в соавторстве с Казаряном Р.В., Варданыном Р.Л.).

8. Получение препаратов бета-каротина из биомассы *Blakeslea trispora* для использования при окраске и витаминизации пищевых продуктов //Материалы конференции / «Использование биомассы микроорганизмов для пищевых целей». - Пушкино, 1984. – С. 20-21. (в соавторстве с Казаряном Р.В., Арутюняном Н.С.).

9. Влияние состава липидной системы на кристаллизацию бета-каротина // Материалы междунар.научн.-техн.конференции / «Новые тенденции в развитии масложировой промышленности». - Пловдив, НРБ, 1987. - С. 10 (в соавторстве с Казаряном Р.В.).

10. Кинетика растворения кристаллического бета-каротина //Изв. ВУЗов СССР. Пищевая технология. – 1987. - №6. – С. 49-52 (в соавторстве с Казаряном Р.В.).

11. Окисление бета-каротина в пищевых продуктах // Материалы междунар. научн.-техн. конференции / «Улучшение качества и расширение ассортимента при маслосеменовании и маслосеменовании». - Пловдив, НРБ, 1988. – С. 33 (в соавторстве с Казаряном Р.В., Варданыном Р.Л.).

12. Распределение основных компонентов липидного комплекса культуры *Blakeslea trispora* в этаноле. Краснодар, 1988. – 5 С. – Деп. в АгроНИИТЭИ-пищепроме 26.04.88, №1806-ПЩ (в соавторстве с Казаряном Р.В.).

13. Структурный анализ биомассы культуры *Blakeslea trispora*. Краснодар, 1988. – 4 С. – Деп. в АгроНИИТЭИ-пищепроме 26.04.88, №1809-ПЩ (в соавторстве с Казаряном Р.В.).

14. Бета-каротин //Пищевая промышленность. – 1988. - №12. - С. 38 (в соавторстве с Казаряном Н.С., Арутюняном Н.С.).

15. Бета-каротин в продуктах //Пищевая промышленность. – 1989. – №10. – С. 25-26 (в соавторстве с Казаряном Р.В.).

16. Перспективы использования бета-каротина //Пищевая промышленность. – 1990. - №9. – С. 60-61 (в соавторстве с Казаряном Р.В.).

17. Способ получения пищевых растительных масел из двух сырых масел. А.с. СССР №1835837, 1992 г. (в соавторстве с Казаряном Р.В., Арутюняном Н.С.).

18. Организация выпуска пищевых продуктов, обогащенных бета-каротином //Тезисы докл. Всесоюзного совещания /«Реализация научно-технической программы «Витаминализация пищи». - Углич, 1990. – С. 104-105 (в соавторстве с Казаряном Р.В., Ремизовой Е.Б.).

19. Обогащение продуктов масложировой промышленности бета-каротином //Тезисы докл. Всесоюзного совещания /«Реализация научно-технической программы «Витаминализация пищи». - Углич, 1990. – С. 164-165 (в соавторстве с Казаряном Р.В.).

20. Закономерности окисления растительных масел //Армянский химический журнал. – 1990. – Т. 43, №7. – С. 417-424 (в соавторстве с Казаряном Р.В., Варданианом Р.Л., Парсяном Г.В.).

21. Кинетика накопления бета-каротина в процессе ферментации культуры *Blakeslea trispora* //Биотехнология. – 1992. - №4. – С. 3-4 (в соавторстве с Казаряном Р.В., Кунщиковой И.С., Кравченко В.В.).

22. Способ получения кристаллического бета-каротина. Патент РФ №1336498, 1993 г. (в соавторстве с Казаряном Р.В., Арутюняном Н.С., Бобневой С.М.).

23. Способ получения кристаллического бета-каротина. Патент РФ №1624952, 1993 г. (в соавторстве с Казаряном Р.В., Арутюняном Н.С., Кунщиковой И.С.).

24. Устройство для экстракции каротина. Патент РФ №1608901, 1993 г. (в соавторстве с Казаряном Р.В., Кравченко В.В., Кунщиковой И.С., Горчаковым В.А., Фютом А.К.).

25. Способ определения бета-каротина в белоксодержащих продуктах. Патент РФ №1730578, 1993 г. (в соавторстве с Казаряном Р.В., Ремизовой Е.Б., Кунщиковой И.С.).

26. Способ получения бета-каротина. Патент РФ №1748446, 1993 г. (в соавторстве с Казаряном Р.В., Кравченко В.В., Арутюняном Н.С., Кунщиковой И.С.).

27. Устройство для получения кристаллического бета-каротина из суспензий. Патент РФ №2088303, 1997 г. (в соавторстве с Казаряном Р.В., Кравченко В.В., Кунщиковой И.С.).

28.Способ лечения эндометриоза. Патент РФ №2108757, 1998 г. (в соавторстве с Чиркиным А.А., Поддубным Н.П., Казаряном Р.В.).

29. Композиция для приготовления лекарственных форм и обогащения продуктов питания «Каролин». Патент РФ №2118528, 1998 г. (в соавторстве с Казаряном Р.В.).

30. Бета-каротин - субстанция для производства лекарственных форм //Тезисы докл. У1 национального конгресса /«Человек и лекарство». - Москва,

1999. – С. 414 (в соавторстве с Казаряном Р.В., Прохоровой Л.В., Шелестовой В.В., Антоновой Н.П.).

31. Разработка препарата гепатопротекторного действия на основе растительных фосфолипидов //Тезисы доклада У1 национального конгресса /«Человек и лекарство». - Москва, 1999. – С. 414 (в соавторстве с Казаряном Р.В., Малявиной В.В., Прохоровой Л.В., Шелестовой В.В., Антоновой Н.П.).

32. Способ получения кристаллического бета-каротина. Патент РФ №2168913, 2001 г. (в соавторстве с Казаряном Р.В.).

33. Пара штаммов гетероталличного гриба *Blakeslea trispora* КР 74⁺ и КР 86⁺, продуцирующая бета-каротин. Патент РФ №2177506, 2001 г. (в соавторстве с Кунщиковой И.С., Казаряном Р.В.).

34. Способ производства мицелиальной массы для получения бета-каротина. Патент РФ №2177506, 2001 г. (в соавторстве с Кунщиковой И.С., Казаряном Р.В.).

35. Применение каролина для профилактики акушерско-гинекологических заболеваний коров //Материалы научн.-практ. конф., посвященной 55-летию ГУ Краснодарская НИВС / «Новые фармакологические средства для животноводства и ветеринарии». – Краснодар, 2001. – Т. 2. – С. 136-137. (в соавторстве с Турченко А.Н., Токаревым В.В., Лимаренко А.А., Поповым Ю.И., Кузьминовой Е.В.).

36. Использование картока в ранний послеродовой период //Материалы научн.-практ. конф., посвященной 55-летию ГУ Краснодарская НИВС / «Новые фармакологические средства для животноводства и ветеринарии». – Краснодар, 2001. – Т. 2. – С. 134-135 (в соавторстве с Турченко А.Н., Поповым Ю.В., Кузьминовой Е.В.).

37. Результаты исследования специфической эффективности карсела //Материалы научн.-практ. конф., посвященной 55-летию ГУ Краснодарская НИВС / «Новые фармакологические средства для животноводства и ветеринарии». – Краснодар, 2001. – Т. 2. – С. 138-139 (в соавторстве с Турченко А.Н., Поповым Ю.И., Кузьминовой Е.В.).

38. Производство бета-каротина и его применение в животноводстве. //Материалы научн.практ. конф., посвященной 55-летию ГУ Краснодарская НИВС / «Новые фармакологические средства для животноводства и ветеринарии». – Краснодар, 2001. – Т. 2. – С. 99-100. (в соавторстве с Казаряном Р.В., Антиповым В.А.).

39. Эффективность использования микробиологического бета-каротина (каролина) в составе комбикорма КР-2 //Международный аграрный журнал. – 2001, №11. – С.29-30 (в соавторстве с Хитриновым Г.М., Пекарским В.А., Заяц О.В.).

40. Разработка методик контроля качества препарата «Каролин» //Материалы У международного съезда / «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения. – Санкт-Петербург, 2001. – С. 361-364. (в соавторстве с Прохоровой Л.В., Шелестовой В.В., Антоновой Н.П., Казаряном Р.В.).

41. Производство бета-каротина и препаратов на его основе с целью профилактики акушерско-гинекологической патологии у сельскохозяйственных животных.

//Материалы международной научно-практической конференции / «Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. – Воронеж, 2002. – С.703-704 (в соавторстве с Турченко А.Н.).

42. Препараты бета-каротина для профилактики акушерско-гинекологической патологии коров //Ветеринария. – 2002, №2. – С. 34-37 (в соавторстве с Турченко А.Н.).

43. Бета-каротин: применение при воспроизводстве животных и птиц (информационный обзор). – Краснодар. – 2002. – 56 с. (в соавторстве с Антиповым В.А., Турченко А.Н., Казаряном Р.В.).

44. Производство бета-каротина и препаратов на его основе с целью профилактики акушерско-гинекологической патологии у сельскохозяйственных животных //Материалы Всероссийской научно-производственной конференции по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии. – Казань, 2002.- Т. 2. – С. 40-42(в соавторстве с Турченко А.Н.).

45. Применение бета-каротина при воспроизводстве животных и птиц//Вестник академии сельскохозяйственных наук. – 2003, №4.- С.64-65 (в соавторстве с Турченко А.Н.).

Лицензия ИД 02334

14.07.2000

Подписано в печать 24.09.03

Формат 60 x 84

Бумага офсетная

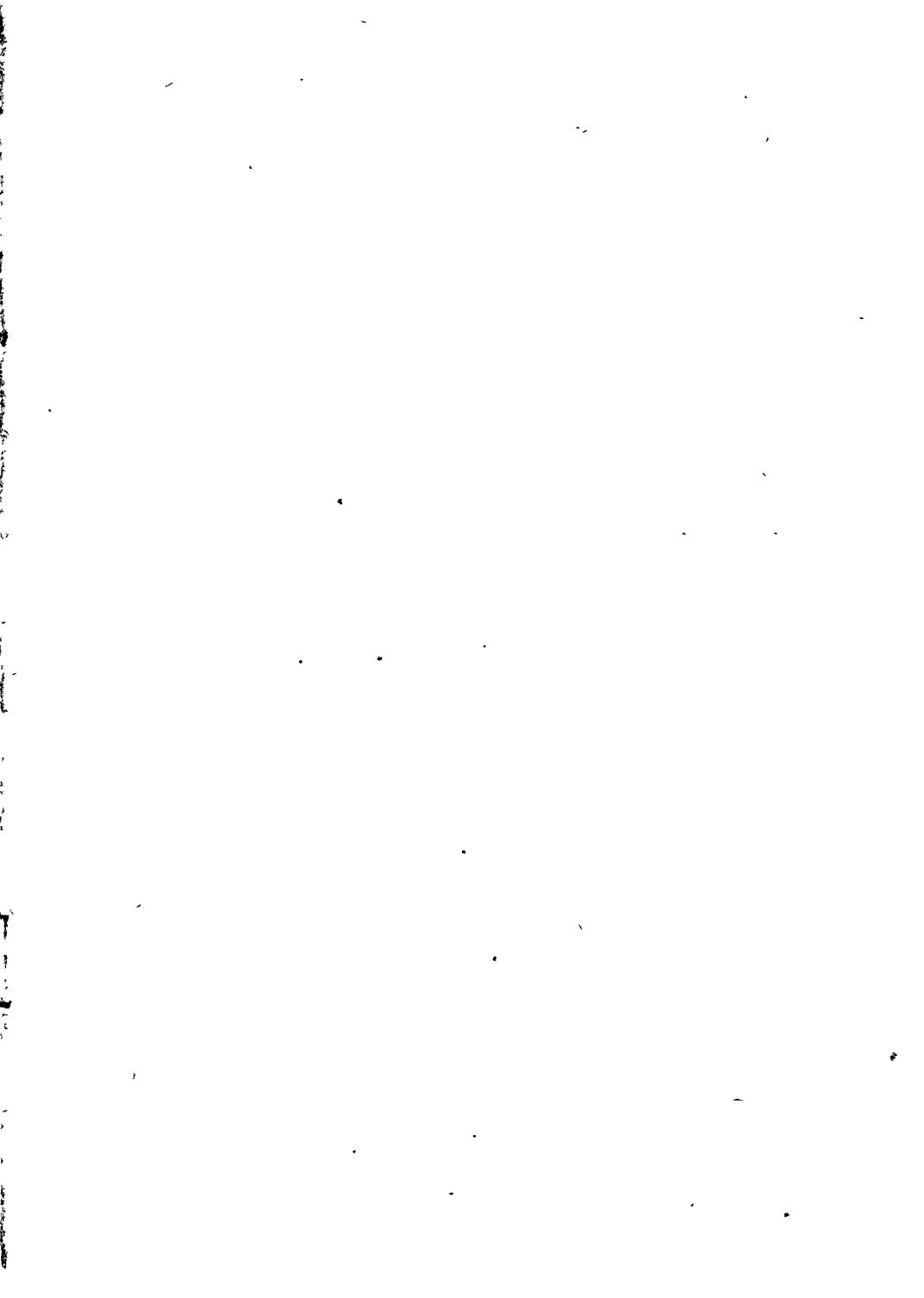
Офсетная печать

Печ. л. 1,5

Тираж 100

Заказ № 558

Отпечатано в типографии КубГАУ, 350044, Краснодар, Калинина, 13



2003-A

15065

15065