

## CHAPTER «BIOLOGICAL SCIENCES»

### PHARMACOLOGICAL STUDY OF OINTMENT BASED ON ZINGIBER OFFICINALE EXTRACT

### ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ МАЗІ НА ОСНОВІ ЕКСТРАКТУ ZINGIBER OFFICINALE

Lidiia Eberle<sup>1</sup>

Alona Kobernik<sup>2</sup>

DOI: <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-077-3-20>

**Abstract.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs such as ibuprofen and diclofenac sodium are widely known drugs for the treatment of inflammatory reactions. Prolonged use of drugs inevitably leads to the development of adverse reactions and reduced immunity of patients. Since the reduction of the «drug load» is an urgent task in this situation, an alternative direction to solve it is the use of natural therapeutic factors, the rehabilitation capabilities of which in these conditions are very appropriate and effective. There is a whole arsenal of medicinal plants in the world, they contain a complex of biologically active substances and are not inferior in therapeutic properties to synthetic agents. Among such medicinal plants is *Zingiber officinale*, which for the past 10 years is actively grown in Ukraine in the city of Kherson. The study shows the relevance of making a mild drug based on a thick extract of the rhizome of *Zingiber officinale*. It is proved that the extract belongs to low-toxic compounds, which allows its use in the composition of drugs for transdermal administration. An ointment was made on the basis of a thick ginger extract with a content of biologically active substances of 0.025%. The content was standardized according to the content of the

---

<sup>1</sup> Candidate of Biological Science, Associate Professor at the Department of Pharmacology and Technology of Drugs, Faculty of Chemistry and Pharmacy, Odesa I.I. Mechnikov National University, Ukraine

<sup>2</sup> Candidate of Biological Science, Associate Professor at the Department of Pharmacology and Technology of drugs, Faculty of Chemistry and Pharmacy, Odesa I.I. Mechnikov National University, Ukraine

sum of polyphenolic compounds. Inflammation was induced by subplantar injection to the plantar fasciitis (aponeurosis) of the hind limb of rats using 30  $\mu$ L AITC solution (100  $\mu$ g/limb) in 1,2-propyleneglycol. The dynamics of changes of inflammatory process was evaluated before addition of the inflammation inducer and after 1, 2, 3, 4, 6 and 24 hours of its injection for measuring the volume and the thickness of affected limb. Ointment based on ginger extract has a high level of anti-inflammatory properties, which is shown on the basis of the positive dynamics of changes in the morphological parameters of the affected limbs of animals. Prophylactic application of the phytopreparation two days before the start of the experiment helped to block the development of inflammation in comparison with the control group and the reference drug – ibuprofen ointment. The soft dosage form created and studied by us based on the thick extract of *Zingiber officinale* is an effective anti-inflammatory agent that can not only treat inflammation, but also block its development under previous prophylactic applications.

### 1. Вступ

Запалення є центральною проблемою багатьох захворювань різної етіології та патогенезу [1]. Це динамічний процес, який розвивається у відповідь на вплив пошкоджуючого фактору та обумовлений реакцією клітин і тканин, яка визначається загальною реактивністю організму, що регулюється нервово-гуморальними механізмами.

Запальний процес виступає як захисний механізм, без якого неможливе відновлення пошкодженої тканини і захист організму від чужорідної генетичної інформації [2]. Розвиток запальної реакції, починаючи від первинного ушкодження і закінчуючи розгортанням повної картини запальної відповіді, супроводжується сенситизацією ноцицептивної системи, яка в свою чергу реалізується у вигляді больових відчуттів [3].

Ефективний контроль болю запального генезу відноситься до переліку першочергових і найбільш важливих завдань медичної практики [4]. Однак, для успішного лікування болю необхідно чітко розуміти механізм його розвитку як складного, багатофакторного системного процесу, пов'язаного, в першу чергу, із механізмом запалення [5]. Це абсолютно необхідно для створення системи раціональної та ефективної анальгетичної і протизапальної терапії, де кожен елемент патогене-

незу повинен розглядатися, як перспективна «мішень» для фармакологічного втручання.

Сьогодні в медицині для лікування запалення та болю використовують великий арсенал лікарських препаратів переважно з групи нестероїдних протизапальних засобів і глюкокортикостероїдів [6; 7]. Однак, наряду з фармакологічними властивостями і високим ступенем клінічної ефективності, всі вони викликають ряд небажаних побічних реакцій [8]. У зв'язку з цим, в останні роки, споживачі віддають перевагу препаратам на основі лікарських рослин, що пов'язано з рядом переваг та прихильністю населення до багатовікового досвіду використання фітопрепаратів [9; 10].

До потенційних джерел лікарських засобів, взятих з народної медицини, можна віднести і кореневище імбиру (*Zingiber officinale*, *Roscoe*), яке, згідно літературних даних, відоме в усьому світі своїми протизапальними, знеболюючими, тонізуючими та жарознижуючими властивостями [11].

Однак, на сьогоднішній день не існує м'якої лікарської форми на основі екстракту *Zingiber officinale* українського виробництва, яка володіла б протизапальними та анальгетичними властивостями.

З огляду на обмежений асортимент вітчизняних препаратів з протизапальною дією, а також численні відомості з літератури про властивості біологічно активних речовин кореневища імбиру, доцільним і актуальним є розробка лікарських форм на основі рослинної сировини.

Метою роботи була розробка лікарської форми на основі екстракту імбиру з протизапальною активністю шляхом експериментального встановлення оптимальної залежності «Доза-ефект» за допомогою комплексного дослідження, – встановлення фармакологічної активності – на моделі алілізотіоціонат-індукованого запалення та моніторинг гематологічних показників в периферичній крові щурів, які мають діагностичне значення під час дослідження протизапальної активності.

### 2. Хімічний склад *Zingiber officinale*

Імбир лікарський – (*Zingiber officinale* *Roscoe*), – багаторічна трав'яниста рослина з тропічного сімейства імбірних (*Zingibiraceae* L.), класу однодольних (*Lillioipsida*).

Головними компонентами хімічного складу кореневища імбиру, які забезпечують багатогранний спектр фармакологічних властивостей, вважаються ефірні масла та фенольні сполуки – гінгероли та шогаоли.

Хімічний склад масла дуже складний та містить більше 150 сполук, більшість з яких відноситься до класу терпеноїдів [12; 13; 14].

Найважливішими складовими масла є сесквітерпенові вуглеводи, подібні бісаболенам. До їх числа відносяться цингіберен (30%), бета- і гамабісаболени (в сумі 13%), бета-сесквіфелландрен (9%) і альфа-куркумін (8%). Для появи лимонних нот запаху, важлива наявність обох геометричних ізомерів цитрала (1,4%), а також цитронелола (2%), його ацетату (0,4%) та інших терпенових спиртів.

На сьогоднішній час відомо, що в кореневищі імбиру містяться 6-8- та 10-гінгероли, проте деякі автори вважають [7], що з практичної точки зору із гінгеролів з різною довжиною ланцюга найбільш важливим є 6-гінгерол, який має антиоксидантні, протизапальні, безпечні властивості, а також використовується для зменшення або позбавлення від побічних ефектів хіміотерапії.

В кореневищі імбиру, містяться такі речовини, як: кверцетин (до 1,29 мг/г сухої маси листя), кемферол – 0,068 мг/г сухої маси кореневищ, катехін та епікатехін – до 0,19 і 0,56 мг/г сухої маси листя відповідно, рутин – близько 0,2 мг/г в листі і 0,4 мг/г в кореневищі, нарінгенін – близько 0,04 мг/г листя та 0,02 мг/г сухої маси кореневищ, куркумін, який відповідає за жовтий колір кореневища. Крім ефірних масел та фенольних сполук, виявлено величезну кількість і інших корисних речовин, таких як: білки, жири, вуглеводи, клітковина, крохмаль, вітаміни та мінеральні компоненти [15; 16; 17].

В роботі Харчилавої І.А. «Фітохімічне вивчення кореневища імбиру аптечного і розробка сухого екстракту на його основі» [18] проведено аналіз компонентного складу кореневищ імбиру різними методами і ідентифіковано 6-гінгерол, дубильні речовини (галову, хлорогенову і кавову кислоти), флавоноїди (лютеолін-7-глікозид, ферулову кислоту та гіперозид). Також були виявлені органічні кислоти (щавлева, бурштинова, яблучна), полісахариди (мальтоза, лактоза, глюкоза і ксиліоза) і терпенові сполуки (гераніол, борнілацетат,  $\alpha$ -пінен, бета-пінен, цитраль і цинеол). Кількісно визначена сума органічних кислот в перерахунку на яблучну кислоту (методом алкаліметрії) – 0,75%,

сума полісахаридів в перерахунку на глюкозу (методом СФМ після реакції з пікриновою кислотою) – 17,68%, дубильні речовини (методом перманганатометрії) – 1,96%, сума фенольних сполук в перерахунку на 6-гінгерол (методом прямої СФМ) – 2,3%, вміст ефірних олій – 2,039%.

### 3. Токсикологічна характеристика густого екстракту *Zingiber officinale*

Грунтуючись на результатах проведеного фіто-хімічного аналізу і враховуючи літературні дані про комплекс біологічно активних речовин, що входять до складу кореневища імбиру [17], важливим є вивчення безпеки застосування його густого екстракту з метою розробки лікарських форм. Тому, необхідним було дослідження безпечності застосування густого екстракту шляхом визначення гострої токсичної дії *in vivo*.

Дослідження токсичності екстракту *Zingiber officinale* проводили на 80 здорових статевозрілих білих щурах лінії Вістар, вагою 180-220 г, яких було розділено на 8 груп по 10 тварин у кожній. Експериментальні тварини утримувалися в умовах вільного доступу до їжі та води при 12-годинному світловому режимі. Експерименти на тваринах проводили відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших дослідних цілях» (Страсбург, Франція, 1986) [18].

Дослідження гострої токсичності екстракту проводили при одноразовому нашкірному його нанесенні в дозах 30, 90, 150, 210, 270, 330, 390, 450 мг/кг маси тіла. Для цього у щурів вистригали на правому боці близько 10% площі поверхні тіла, після чого одноразово наносили скляною паличкою тонким шаром густий екстракт та рівномірно розподіляли по всій поверхні.

Токсичність при повторному введенні досліджували впродовж 14 діб в аналогічних дозах. Введення екстракту проводили один раз на добу (вранці). Підрослу в області нанесення препаратів шерсть видаляли кожні 7 днів. Спостереження за загальним станом і поведінкою тварин проводили протягом двох тижнів, враховували зовнішній

вигляд тварин, особливості поведінки, інтенсивність і характер рухів, стан волосяного покриву і слизових оболонок.

Для обробки отриманих результатів та визначення середньої летальної дози (ЛД<sub>50</sub>) та токсичної дії (ТД<sub>50</sub>) використовували метод Спірмена-Кербера.

Згідно результатів дослідження відзначено, що будь-яких змін в загальному стані тварин, особливостях їх поведінки, тонусі скелетних м'язів, споживанні корму і води, діурезі і дефекаціях не виявлено. Вживання тварин в дослідних групах склало 100%. Введення досліджуваного екстракту в дозі 450 мг/кг маси тіла не призвело до загибелі жодної тварини протягом двох тижнів, тобто густий екстракт за класифікацією токсичності О.В. Стефанова відноситься до 4 класу сполук – малотоксичні сполуки (табл. 1).

За даними дослідження гострої токсичності встановлено, що досліджуваний екстракт *Zingiber officinale* не проявляє ознак токсичності, проте не менш важливим є дослідження та встановлення можливої небезпеки для здоров'я пролонгованих введень екстракту, яке здатне привести до розвитку інтоксикації внаслідок накопичення в організмі, метаболічних змін, порушення гомеостазу.

Таблиця 1

**Гостра токсичність (ЛД<sub>50</sub>) екстракту *Zingiber officinale*  
за умов трансдермального введення**

| Токсична характеристика | ЛД <sub>50</sub> , мг/кг маси тіла |    |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------|------------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                         | 30                                 | 90 | 150 | 210 | 270 | 330 | 390 | 450 |
| Вижило                  | 10                                 | 10 | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  |
| Загинуло                | 0                                  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |

Аналізуючи отриманні данні (табл. 2), слід відмітити, що при однократному, щоденному введенні екстракту імбиру впродовж 14 діб в більшості груп тварин не відзначалось суттєвих змін. Усі щури мали охайний вигляд, були активні, мали рівну блискучу шерсть, шкіру без слідів розчісування, без язв і облісіння, забарвлення слизових – без патологічних змін. Ділянки шкіри після нанесення екстрактів мали блідо-рожевий колір. За винятком, лише груп тварин, яким вводили великі об'єми екстрактів (від 390 до 450 мг/кг) (табл. 2).

**Токсична дія (ТД<sub>50</sub>) екстракту *Zingiber officinale*  
за умов однократного трансдермального введення**

| Токсична характеристика        | ТД <sub>50</sub> , мг/кг маси тіла |    |     |     |     |     |     |     |
|--------------------------------|------------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                | 30                                 | 90 | 150 | 210 | 270 | 330 | 390 | 450 |
| Відсутність побічних впливів   | 10                                 | 10 | 10  | 10  | 10  | 10  | 5   | 3   |
| Подразнююча дія (почервоніння) | 0                                  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 5   | 7   |

Трансдермальне введення екстракту *Zingiber officinale* в дозі 390 та 450 мг/кг сприяло у деяких тварин дослідних груп прояву алергічної реакції (почервоніння та подразнення шкіряного покриву), що в подальшому при аплікації екстракту викликало у тварин больові відчуття. Таким чином, за результатами проведених досліджень встановлено, що при повторних введеннях екстракту імбиру ТД<sub>50</sub> = 420 мг/кг маси тіла тварин.

#### 4. Методика приготування м'якої лікарської форми на основі густого екстракту імбиру

У процесі розробки складу і технології мазі на основі екстракту імбиру, велике значення мав вибір оптимальної основи. Серед вимог до маzewої основи – здатність вивільняти активні компоненти і мати необхідні структурно-механічні властивості [19; 20].

Проаналізувавши літературні джерела та вивчивши вміст БАР в кореневищі імбиру, для виготовлення експериментальної мазі була обрана основа, яка складалася з поліетиленгліколю (ПЕГ) – 1500, поліетиленоксиду (ПЕО) – 400 та 1,2 – пропіленгліколю при співвідношенні компонентів: ПЕГ-1500 : ПЕО-400 : 1,2-ПГ, як 4 : 2 : 3.

Для скринінгових досліджень антиексудативних та анагетичних властивостей було створено ряд мазей з різною концентрацією БАР густого екстракту імбиру (0,0125; 0,025; 0,05 %) в перерахунку на суму поліфенольних сполук.

#### 5. Вивчення протизапальної активності мазі на основі густого екстракту імбиру на моделі алізіотіоціанат-індукованого запалення

У багатьох областях медицини, біології та фармакології фундаментальною проблемою є вивчення механізмів впливу лікарських засобів

на біологічні об'єкти. Зокрема, актуальним це питання є при створенні нових препаратів, де особливою уваги заслуговує аналіз зв'язку доза-ефект, від результатів якого залежать особливості практичного застосування. Спектр проявів терапевтичної активності більшості препаратів обумовлений якісним складом активних сполук, проте, вираженість ефекту залежить від кількісних характеристик діючого агента у лікарському засобі. Тому, головним етапом у дослідженні протизапальної активності мазі на основі екстракту імбиру було встановлення залежності «доза-ефект».

Відкриття представників родини TRP рецепторів надало ряд нових потенційних терапевтичних мішеней для лікування гострого болю запального генезу. Здатність впливати на TRP-канали дає можливість моделювати запалення та вивчати активність нових протизапальних та знеболюючих препаратів.

Алілізотіоціанат є агоністом TRPA1-каналів, який активує їх периферичні рецептори за рахунок зв'язування з трьома залишками цистеїну та лізину в N-кінцевій зоні рецептора, тим самим викликаючи відчуття гострого болю та розвиток запального процесу у експериментальних тварин [19; 20; 21; 22].

Отже, для дослідження протизапальної активності мазі на основі густого екстракту *Zingiber officinale* було використано моделі алілізотіоціанат-індукованого запалення.

Схема дослідження була спланована таким чином, що деяким групам аплікації відповідних мазей почали здійснювати до ведення запального агента та продовжували терапію після індукції запалення. Другій частині груп дослідних тварин починали наносити відповідні мазі на місце ураження лише після ін'єкції флогогену. На скринінговому етапі визначення залежності «доза-ефект» було використано 3 зразки мазі, які містили густий екстракт кореневища імбиру в концентрації 0,0125, 0,025, та 0,05% в перерахунку на суму поліфенольних сполук.

Дослідження проводили на здорових статевозрілих білих щурах лінії Вістар, масою 180-220 г. Для експерименту було відібрано 90 тварин, які поділялись на 9 груп:

Тварини 1-ї групи були контролем розвитку патології (не піддавались лікуванню після введення флогогену). Тварин 2-ї групи лікували 0,05% маззю, 3-ї групи – 0,025% і 4-ї групи – 0,0125% через одну



годину після введення флогогену. Тварин 5, 6, 7-ї групи лікували 0,05 %; 0,025 % і 0,0125 % мазями відповідно, з додатковою попередньою аплікацією мазі за два дні до введення індуктора запалення і продовженням лікування після розвитку запалення. Тваринам 8 та 9 групи наносили референт-препарат, за 2 дні до експерименту (8 група) та після введення флогогену (9 група). Як референт-препарат використовували Долгіт – крем (ібупрофен 5 %).

Запалення викликали шляхом субплантарного введення 30 мкл розчину АІТЦ (100 мкг/кінцівку) у 1,2-пропіленгліколі під плантарний апоневроз задньої кінцівки щурів.

Динаміку зміни запального процесу оцінювали через 1, 2, 3, 4, 6 та 24 години після введення флогогенного агента шляхом вимірювання морфологічних показників – об'єму ураженої кінцівки та товщини. М'яка лікарська форма додатково наносилась на уражену кінцівку після кожного заміру її об'єму.

Отримані результати були статистично оброблені, а також для всіх груп були розраховані показники приросту об'єму та антиексудативна активність, яка, по суті, являє собою якісний показник гальмування розвитку запалення в дослідних групах в порівнянні з контрольною.

**Приріст об'єму (ПО) кінцівки розраховували за формулою:**

$$ПО = \left( \frac{O - I}{I} \right) * 100$$

*O* – величина об'єму лапи після введення індуктора запалення;

*I* – величина об'єму лапи до введення індуктора запалення.

**Антиексудативну активність (АА) розраховували за формулою:**

$$АА = 100 - \left( \frac{O - I}{I} \right)_{(д)} ; \left( \frac{O - I}{I} \right)_{(к)} * 100$$

*O* – величина об'єму лапи після введення індуктора запалення;

*I* – величина об'єму лапи до введення індуктора запалення.

*д* – дослідна група;

*к* – контрольна група.

Значення товщини ураженої кінцівки виражали у відсотках відносно вихідних даних.

За результатами проведеного дослідження показано, що в контрольній групі тварин субплантарне введення АІТЦ викликало запальну

реакцію, яка досягала свого піку на 3 годину після введення флогогенного агенту і зберігалася на досить високому рівні впродовж всього дослідження (24 годин).

Натомість, у дослідних груп тварин, які піддавалися лікувальним процедурам з нанесенням мазей з імбиром, ступінь запальної реакції почав поступово знижуватися вже на першу та другу годину, і до кінця терміну лікування він практично був відсутній (табл. 3, табл. 4 та рис. 1).

Таблиця 3

**Приріст об'єму, у % до вихідних значень  
за умов попередньої аплікації до введення флогогену**

| № гр | Концентрація мазі, в % | Час спостереження (год) |           |           |           |           |           |
|------|------------------------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|      |                        | 1                       | 2         | 3         | 4         | 6         | 24        |
| 1.   | Контроль               | 44,9±0,4                | 52,2±3,7  | 57,9±4,3  | 39,1±3,7  | 28,9±2,5  | 7,25±0,6  |
| 2.   | 0,05                   | 34,3±2,9                | 38,7±3,4* | 40,4±3,2* | 34,6±2,9  | 26±1,8    | 19,2±1,3* |
| 3.   | 0,025                  | 33,3±2,8                | 27,2±2,4* | 21,1±1,8* | 18,1±1,3* | 9,1±0,7*  | 3,0±0,2   |
| 4.   | 0,0125                 | 43,8±3,2                | 42,5±3,7  | 47,9±4,2  | 35,6±3,8  | 32,8±2,7  | 12,3±1,4  |
| 5.   | Долгіт крем            | 42,7±3,9                | 35,3±3,1* | 25,0±2,3* | 20,6±1,7* | 14,7±0,8* | 5,8±0,4   |

Примітка: статистично значуща різниця у порівнянні з контрольною групою – \* ( $p < 0,05$ ).

Зокрема, у ході експерименту встановлено, що найбільший антиексудативний ефект протягом першої години дослідження відзначався у групах тварин, яким профілактично (за 2 дні до експерименту) наносили 0,025 та 0,05% мазі. Тому, можливо припустити, що попередні аплікації мазей з екстрактом імбиру на кінцівку тварин сприяли блокуванню розвитку запалення, викликаного ін'єкцією алілізотіоціаната (табл. 4, рис. 1).

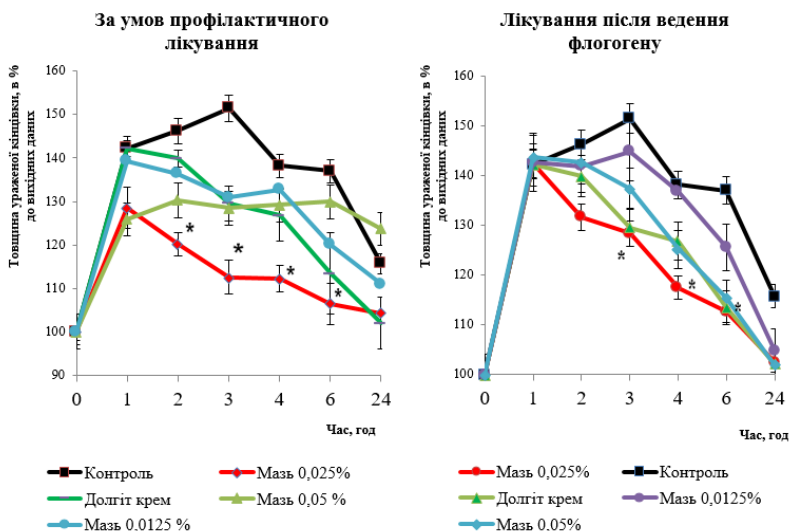
На першу годину дослідження 0,025 та 0,5% мазі, за умов профілактичного нанесення, мали схожий протизапальний ефект, пригнічуючи приріст об'єму в середньому на 10% та знижуючи показники товщини уражених кінцівок на 15% у порівнянні з контрольною групою, та на 8 і 12% у порівнянні з референс-препаратом, відповідно (рис. 1).

**Антиексудативна активність в % до контролю  
за умов попередньої аплікації до введення флогену**

| № гр                                       | Концентрація мазі, в % | Час спостереження (год) |          |          |          |          |          |
|--|------------------------|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|  |                        | 1                       | 2        | 3        | 4        | 6        | 24       |
| Антиексудативна активність в % до контролю |                        |                         |          |          |          |          |          |
| 2.   | 0,05                   | 23,7±1,6                | 44,8±3,5 | 52,7±4,6 | 36,9±2,9 | 10,2±1,1 | -        |
| 3.   | 0,025                  | 25,8±2,4                | 47,7±3,3 | 63,4±4,9 | 53,5±4,7 | 68,6±5,4 | 58,2±5,5 |
| 4.   | 0,0125                 | 2,43±0,3                | 18,6±1,3 | 17,3±1,5 | 8,9±0,7  | -        | -        |
| 5.   | Долгіт крем            | 9,6±0,6                 | 21,4±1,2 | 56,8±4,5 | 47,4±3,9 | 49,3±4,3 | 18,8±1,4 |

Примітка: статистично значуща різниця у порівнянні з контрольною групою – \* ( $p < 0,05$ ).

Подальше лікування 0,025% маззю достовірно знижувало вираженість запалення з поверненням до початкових параметрів на 6 годину



**Рис. 1. Протизапальна активність мазей на основі густого екстракту імбиру (товщина уражених кінцівок шурів, у % до інтактних, ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ))**

Примітка: \* –  $p < 0,05$  (порівняно з контрольною групою).

дослідження, на відмінну від 0,05% мазі, яка впродовж 2 та 3 години експерименту сприяла збільшенню осередку запалення (об'єму на 40%, товщини на 30%) відносно вихідних значень.

Дослідження показало, що профілактичне нанесення препарату порівняння за два дні до початку експерименту не впливало на пригнічення запалення, на відміну від досліджуваних мазей на основі екстракту, а протизапальну дію референс-препарат проявляв безпосередньо після розвитку запалення (рис. 1).

Слід відзначити, що аплікація 0,0125% мазі за умов профілактичного нанесення сприяла протизапальному ефекту впродовж перших годин експерименту та вже на 3 годину дослідження пригнічували об'єм і товщину осередку запалення в середньому на 13% та 15%, порівняно з контролем. Проте, незважаючи на антиексудативні властивості 0,0125% мазі на основі екстракту імбиру, дана концентрація мазі поступалась терапевтичній ефективності 0,025% мазі та еталонному препарату порівняння (табл. 3, табл. 4 та рис. 1).

Лікування 0,0125% маззю після ін'єкції флогогену не впливало на ступінь запальної реакції, так як приріст об'єму і товщини кінцівок щурів збільшувались, сягнувши свого піку на 3-ю годину експерименту. Впродовж подальших спостережень суттєвих протизапальних властивостей не відзначалось, а дія мазі була еквівалентна параметрам тварин у контрольній групі (табл. 5, 6, рис. 1).

Лікувальні процедури з використанням 0,025 та 0,05% мазей на основі екстракту імбиру після ін'єкції АІТЦ показали, що вже перші аплікації досліджуваних мазей сприяли пригніченню запальної реакції та ініціювали тенденцію до поступового зменшування набряку уражених кінцівок.

Згідно проведених досліджень показано, що найкраща динаміка зміни показників осередку запалення, за умов лікування після введення флогогену, була притаманна в групі, для лікування якої використовували 0,025% мазь. Протизапальна активність 0,025% мазі на 3 годину експерименту складала 56,8% та достовірно не відрізнялась від активності препарату порівняння, а при подальшому застосуванні навіть перевершувала за ефективністю Долгіт крем.

Аналіз результатів, отриманих при вивченні протизапальної активності 0,05% мазі на моделі алілізотіоціанатного запалення показав, що

**Приріст об'єму, у % до вихідних значень  
за умов аплікації мазі через 1 год після ін'єкції флогогену**

| № гр                                    | Концентрація мазі, в % | Час спостереження (год) |           |           |           |           |         |
|---|------------------------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|
|   |                        | 1                       | 2         | 3         | 4         | 6         | 24      |
| Приріст об'єму, у % до вихідних значень |                        |                         |           |           |           |           |         |
| 1.                                      | Контроль               | 44,9±4,6                | 52,2±4,2  | 57,9±5,1  | 39,1±2,8  | 28,9± 2,3 | 7,2±0,6 |
| 2.                                      | 0,05                   | 40,6±3,9                | 42,2±4,5  | 35,9±3,3* | 25±2,1 *  | 15,6±1,1* | 3,3±0,4 |
| 3.                                      | 0,025                  | 39,1±3,1                | 26,7±2,2* | 25±1,6*   | 14±1,2*   | 10,9±1,0* | 1,5±0,7 |
| 4.                                      | 0,0125                 | 39,1±3,4                | 40,6±4,2  | 42±3,5    | 31,8±2,5  | 26,1±1,6  | 4,3±3,7 |
| 5.                                      | Долгіт крем            | 39,7±3,3                | 35,3±2,8* | 25±1,6*   | 20,6±1,8* | 14,7±1,3* | 5,8±0,4 |

Примітка: \* – статистично значуща різниця у порівнянні з контрольною групою ( $p < 0,05$ ).

досліджувана концентрація мазі мала виражену антиексудативну дію, яка на третю годину спостереження становила 38 % та мала тенденцію до збільшення протягом наступних годин лікування.

Підсумовуючи вищевикладене, можна дійти висновку, що за динамікою змін морфологічних показників 0,025 % мазь на основі екстракту імбиру ефективно пригнічувала розвиток запального процесу, індукованого субплантарним введенням АІТЦ.

**Антиексудативна активність, в % до контролю  
за умов аплікації мазі через 1 год після ін'єкції флогогену**

| № гр                                       | Концентрація мазі, в % | Час спостереження (год) |          |          |           |          |          |
|--|------------------------|-------------------------|----------|----------|-----------|----------|----------|
|  |                        | 1                       | 2        | 3        | 4         | 6        | 24       |
| Антиексудативна активність в % до контролю |                        |                         |          |          |           |          |          |
| 2.   | 0,05                   | 9,6±1,2                 | 19,1±1,4 | 38±2,3   | 42,1± 3,5 | 46±4,2   | 52,7±5,1 |
| 3.   | 0,025                  | 13±1,4                  | 43,1±2,9 | 56,8±4,7 | 64,1±5,3  | 62,3±5,1 | 78,4±6,5 |
| 4.   | 0,0125                 | 12,9±1,4                | 22,2±2,1 | 27,5±1,6 | 18,5±1,2  | 10±0,8   | 40±3,8   |
| 5.   | Долгіт крем            | 11,6±0,2                | 21,4±2,8 | 56,8±3,4 | 47,4±4,5  | 49,3±3,7 | 52,8±4,9 |

Примітка: \* – статистично значуща різниця у порівнянні з контрольною групою ( $p < 0,05$ ).

Разом з тим, було здійснено моніторинг динаміки зміни гематологічних показників в периферичній крові щурів, які мають діагностичне значення під час дослідження протизапальної активності.

Особливе діагностичне значення при оцінці запального процесу відводиться лейкоцитам та відсотковому співвідношенню різних їх форм, що забезпечує можливість моніторингу перебігу захворювання та здійснення контрольованого лікування [23; 24; 25]. Динаміку зміни гематологічних показників крові щурів реєстрували через 6 та 24 години після введення запального агенту у порівнянні з вихідними показниками.

На початку експерименту у всіх піддослідних групах тварин загальний вміст лейкоцитів, як і їх відсоткове співвідношення знаходилося в межах фізіологічної норми.

Субплантарне введення в задню кінцівку тварин запального агенту мало суттєве відображення на показниках «білої крові». На 6-ту годину експерименту при АІТЦ-індукованому запаленні спостерігалось зниження загальної кількості лейкоцитів (лейкопенія) у більшості груп тварин по відношенню до вихідних значень.

Слід відмітити, що найменші прояви запального процесу, які супроводжувались незначними змінами кількісного вмісту лейкоцитів реєструвались в групах тварин, де проводили терапію 0,025% маззю з екстрактом імбиру (в середньому на 15%) та референс-препаратом (на 14%), тоді як у контрольній групі зниження вмісту лейкоцитів складало 25% (табл. 7).

Як відомо, вміст лейкоцитів в крові при запаленні відображає співвідношення між еміграцією їх з крові у осередок запалення і надходженням з кісткового мозку в кров. Виражена тенденція до зменшення загальної кількості лейкоцитів в крові на 6-ту годину свідчить про переважання еміграції лейкоцитів в осередок запалення над надходженням їх з кісткового мозку. В результаті в цей період спостерігається транзисторна лейкопенія.

Через 24 години в усіх піддослідних групах тварин відзначалось підвищення загальної кількості лейкоцитів (лейкоцитоз), їх вміст достовірно перевищував початкові показники. Дане явище пов'язане з інтенсивністю еміграції лейкоцитів з кісткового мозку в кров внаслідок активації кровотворення.

**Кількісний вміст лейкоцитів ( $10^9/\text{л}$ ) в крові щурів на 6 годину після індукції короткотривалих запалень ( $M \pm m$ ) ( $n=10$ )**

| Групи  | Вихідні значення | Через 6 год | Через 24 год |
|--|------------------|-------------|--------------|
| Контроль   | 7,3±0,8          | 5,5±0,4*    | 12,4±0,7*    |
| Профілактичні аплікації мазі з подальшим лікуванням після ін'єкції флогогену |                  |             |              |
| Мазь 0,0125 %  | 9,1±0,8          | 7,4±0,6     | 15±1,7       |
| Мазь 0,025 %   | 7,8±0,8          | 7,1±0,6     | 8,8±0,7      |
| Мазь 0,05 %  | 8,5±0,8          | 5,4±0,6*    | 19±1,5       |
| Долгіт крем  | 8,3±0,8*         | 6,1±0,6*    | 9,4±0,4      |
| <b>Лікування маззю після введення флогогену</b>                              |                  |             |              |
| Мазь 0,0125 %  | 7,7±0,8          | 6,2±0,6     | 18,5±1,2     |
| Мазь 0,025 %   | 8,5±0,8          | 7,4±0,6     | 8,3±0,2      |
| Мазь 0,05 %  | 9,3±0,8          | 8,6±0,6     | 21±1,6       |
| Долгіт крем  | 8,6±0,8          | 7,7±0,6     | 9,4±0,6      |

Примітка: \* – статистично значуща різниця у порівнянні з вихідними даними ( $p < 0,05$ ).

Згідно результатів дослідження, показано, що максимальне підвищення концентрації «білої крові» відзначалось при аплікації 0,05 % мазі, яке співпадало з показниками контролю. Лікування 0,05 % маззю після введення алілізотіоціанату стимулювало підвищення загальної кількості лейкоцитів в середньому на 91 % (табл. 7).

В крові тварин, яких лікували 0,025 % маззю з екстрактом імбиру та референс-препаратом простежувалась одна і та ж закономірність – в ранні терміни (на 6 годину) кількісний вміст лейкоцитів в крові дещо знижувався, та через 24 години спостерігалось незначне підвищення у порівнянні з іншими групами тварин. Так, загальна кількість показників «білої крові» через 1 добу за умов профілактичної аплікації 0,025 % мазі в середньому збільшувались на 16 %, що свідчить про ефективне лікування запалення 0,025 % маззю у порівнянні з природним перебігом процесу в контрольній групі та іншими концентраціями мазей (табл. 7).

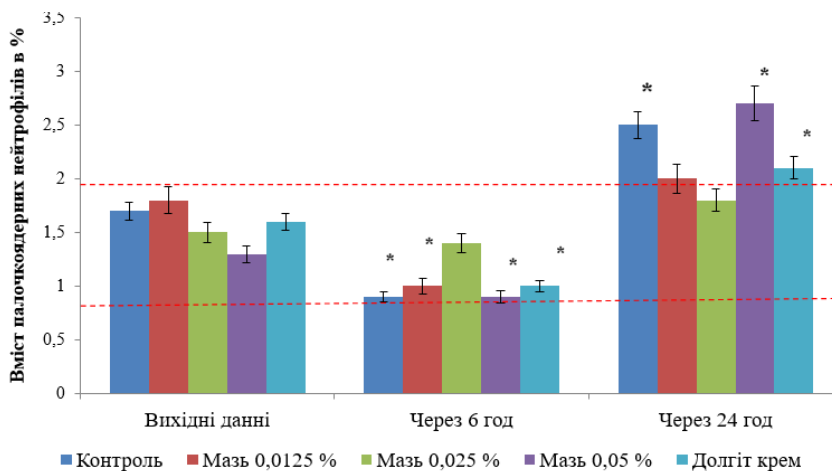
При порівняльній інтерпретації формених елементів лейкоцитарної формули крові, показано, що спільними ознаками на 6 годину експерименту, було достовірне зниження кількості нейтрофільних лейкоцитів у всіх групах тварин порівняно з вихідними показниками.

На 6 годину експерименту у всіх групах тварин відзначалась виражена тенденція до зниження кількості палочкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів в периферичній крові щурів, що збігається із загальною кількістю лейкоцитів і, мабуть, пов'язано з їх еміграцією у осередок запалення (рис. 2, рис. 3).

Через 24 години у піддослідних тварин відзначалась тенденція до збільшення вмісту палочкоядерних нейтрофілів в порівнянні з інтактними тваринами, що збігалось з розвитком лейкоцитозу, обумовленим активацією кровотворення.

Найбільший рівень палочкоядерних нейтрофілів, на 24 годину, відзначався в контрольних групах тварин (в середньому в 2 рази,  $p < 0,05$ ), а найменший в групах, яких лікували 0,025% маззю та референс-препаратом.

Слід відзначити, що при моделюванні АІТЦ запалення, профілактичні аплікації 0,025% мазі сприяли незначному зниженню палочкоядерних нейтрофілів на 6-у годину та помірному збільшенню на



**Рис. 2. Динаміка зміни вмісту палочкоядерних нейтрофілів (%) в периферичній крові щурів (за умов профілактичного нанесення мазей)**

Примітка: \* – статистично значуща різниця у порівнянні з вихідними даними ( $p < 0,05$ ).  
 ----- – межі фізіологічної норми.

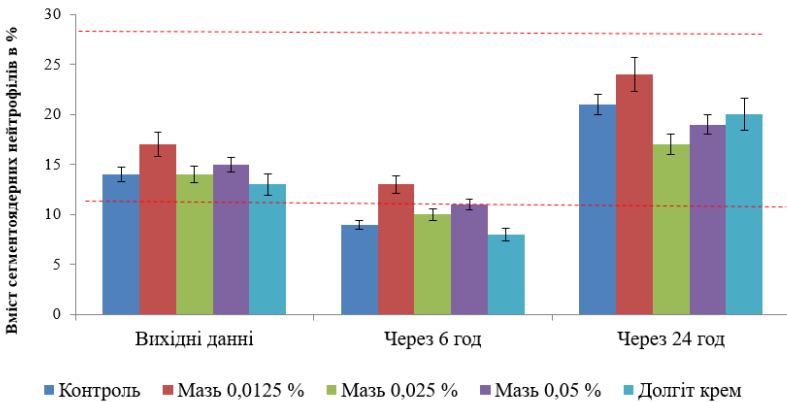


24-у годину, що свідчить про успішну елімінацію флогогену та припинення запального процесу на ранніх етапах (рис. 2).

Аналогічна тенденція до зниження на 6-ту годину дослідження відзначалась і для сегментоядерних нейтрофілів, які мігрували в сервовище запалення внаслідок дії альтеруючого фактора.

Через 24 години після введення прозапальних агентів у всіх дослідних групах тварин відзначалась відносна нейтрофілія зі збільшенням відсоткового вмісту сегментоядерних нейтрофілів на тлі загального лейкоцитозу (рис. 3). Проте в всіх групах тварин збільшення кількості нейтрофілів було незначне та знаходилось в межах фізіологічної норми.

Змін в кількості еозинофілів та моноцитів при моделюванні АІТЦ запалення впродовж 24 годин практично не відзначалося. Натомість спостерігалось, незначне зменшення кількості лімфоцитів, яке варіювало в межах від 5 до 10%, проте, незважаючи на незначні коливання, вміст даного показника знаходився в межах фізіологічної норми. Такі незначні зміни в кількості лімфоцитів на ранніх стадіях запалення свідчать про міграцію клітин до лімфоутворюючих органів, сигналізуючи про необхідність активації імунної відповіді на флогогенне втру-



**Рис. 3. Динаміка зміни вмісту сегментоядерних нейтрофілів (%) в периферичній крові щурів (за умов профілактичного нанесення мазей)**

Примітка: \* – статистично значуща різниця у порівнянні з вихідними даними ( $p < 0,05$ ).

----- – межі фізіологічної норми.

чання. Зниження вмісту лімфоцитів в більшості випадків залежить від інтенсивності запального процесу.

## 6. Висновки

Методом *in vivo* встановлено, що за параметрами гострої токсичності густий екстракт *Zingiber officinale* при наскірній аплікації шурам відноситься до IV класу сполук – малотоксичні сполуки.

За результатами проведених досліджень показано, що на моделі алілізотіоціанат-індукованого запалення 0,025 % мазь на основі густого екстракту *Zingiber officinale* проявляла найбільш виражену протизапальну активність, яка не поступалась за активністю препарату порівняння (Долгіт крем). Встановлено, що з підвищенням концентрації від 0,0125% до 0,025 % протизапальна активність досліджуваних зразків прогресивно зростала, однак подальше збільшення вмісту екстракту в зразках досліджуваної мазі (до 0,05 %) не призводило до підвищення протизапальної активності, а, натомість, діючі компоненти мазі виступали як прозапальні агенти, збільшуючи осередок запалення.

Експериментальні данні свідчать, що використання 0,025 % мазі з екстрактом імбиру сприяє зниженню загальної кількості лейкоцитів та відновлює відсоткове співвідношення показників лейкограми, на відміну від результатів контрольної групи та груп, які отримували лікування мазями з іншою концентрацією діючих речовин.

Доведено, що профілактичні аплікації 0,025 % мазі на моделі АІТЦ-запалення сприяли блокуванню розвитку запалення після ін'єкції флогогену, тому можна стверджувати, що принаймні одним із механізмів протизапальної активності БАР в складі густого екстракту імбиру є саме антагонізм по відношенню до TRPA1 рецепторів.

Таким чином, проведені експериментальні дослідження доводять доцільність застосування мазі з екстрактом *Zingiber officinale* в комплексній терапії запальних та больових захворювань.

## Список літератури:

1. Литвицкий П. Ф. Воспаление. *Вопросы современной педиатрии*. 2017. № 5(6). С. 60–63.
2. Акімова В. М., Лаповець Л. Е. Системні прояви запалення при гострих та хронічних абдомінальних захворюваннях. *Фізіологічний журнал*. 2018. № 64. С. 50–53.

3. Мокрик О. Я. Експресія маркерів емоційно-больового стресу після видалення ретенуваних нижніх третіх молярів у хворих. *Вісник наукових досліджень*. 2019. № 2. С. 78–84.
4. Глумчер Ф. С. Клінічні постанови : монографія. НФаУ. Харків : Фект, 2017. Том 2. 117 с.
5. Лященко О. В. Больвовий синдром при онкологічних захворюваннях та способи боротьби з ними. *Медицина невідкладних станів*. 2019. № 3(98). С. 32.
6. Яковлева Л. В., Тітова А. А. Дослідження асортименту групи лікарських засобів НПЗЗ на фармацевтичному ринку в Україні за період 2014–2018 років. *Фармацевтичний журнал*. 2019. № 4. С. 41–51.
7. Журавлева М. В., Кукес В. Г., Прокофьев А. Б. Рациональное применение НПВП – баланс эффективности и безопасности (обзор литературы). *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016. № 6–4. С. 687–696.
8. Москаль О. М., Логай І. В., Турок Ю. Ю. Особливості проявів, лікування та профілактики НПЗП-індукованої гастродуоденопатії у хворих відділень різного профілю. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна*. 2019. № 4. С. 43–48.
9. Мірзоева Т. В. Аналіз сучасного стану виробництва лікарських рослин в Україні. *Класичний приватний університет*. 2018. Вип. 6(11). С. 62–67.
10. Білай І. М., Остапенко А. О., Красько М. П., Білай А. І. Експериментальне дослідження фітопрепаратів, які містять фенольні сполуки *Науковий огляд*. 2018. № 7(50). С. 34–41.
11. Вальчихина О. Ю., Демина Н. Б., Надер А. Корневище имбиря как перспективное растительное сырье для создания лекарственных средств. *Научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств»*. 2016. № 4(17). С. 1–16.
12. Руднов В. А. От локального воспаления к системному: выход на новые представления патогенеза критических состояний и перспективы терапии. *Интенсивная терапия*. 2006. Т. 3. № 1. С. 5–8.
13. Литвицкий П. Ф. Патофизиология. 2 изд. Москва : ГЭОТАР МЕД., 2003. Т. 1. 752 с.
14. Крыжановский Г. Н. Дизрегуляционная патология : рук. для врачей и биологов. Москва : Медицина, 2002. 632 с.
15. Shukla Y., Singh M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. *Food Chemistry Toxicology*. 2007. № 45(5). P. 683–690.
16. Bhattarai S., Tran V. H., Duke C. C. The stability of gingerol and shogaol in aqueous solutions. *J. Pharm. Sci.* 2001. P. 1658–1664.
17. Puengphian C., Sirichote A. [6]-gingerol content and bioactive properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts from supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Asian Journal of Food Agro-Industry*. 2008. № 1(1). P. 29–36.
18. Харчилава И. А. Фитохимическое изучение корневища имбиря аптечного и разработка сухого экстракта на его основе : дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.01 / НФаУ. Москва, 2011. 151 с.

19. Eberle L., Kobernik A., Alexandrova O., Kravchenko I. Optimization of extraction methods for total polyphenolic compounds obtained from rhizomes of *Zingiber officinale*. *Trends in Phytochemical Research*. 2018. № 2(1). P. 37–42.
20. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Specific Purposes, Strasbourg, Council of Europe. 1986. № 123. P. 51.
21. Иванова Л. А. Технология лекарственных форм : учебник в 2-х т. Москва : Медицина, 2008. 544 с.
22. Taylor-Clark T. E. Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4oxononanal. *J Physiol*. 2008. Vol. 586. № 14. P. 3447–3459.
23. Trevisan G. TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout. *Free Radic Biol Med*. 2014. Vol. 72. P. 200–209.
24. Andersson D. A. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci*. 2008. Vol. 28. № 10. P. 2485–2494.
25. Wang Y. Y. The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *J Biol Chem*. 2008. Vol. 283. № 47. P. 32691–32703.
26. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. Изд. 2-ое, переработанное и дополненное. Москва : МЕДпресс-информ, 2004. 920 с.
27. Трухачева Н. В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. Минск : ГЭОТАРМедиа, 2013. 377 с.

### References:

1. Litvitskiy P. F. (2017) Vospaleniye. Voprosy sovremennoy pediatrii, no. 5(6), pp. 60–63.
2. Akimova V. M., Lapovets L. E. (2018) Systemni proiavy zapalennia pry hostrykh ta khronichnykh abdominalnykh zakhvoriuvanniakh. *Fiziologichnyi zhurnal*, no. 64, pp. 50–53.
3. Mokryk O. Ya. (2019) Ekspresiiia markeriv emotsiino-bolovoho stresu pislia vydalennia retenovanykh nyzhnykh tretikh moliariv u khvorykh. *Visnyk naukovykh doslidzhen*, no. 2, pp. 78–84.
4. Hlumcher F. S. (2017) Klinichni postanovy: monohrafiia. NFaU. Kharkiv: Fekt, tom 2, 117 p.
5. Liashchenko O. V. (2019) Bolovyi syndrom pry onkologichnykh zakhvoriuvanniakh ta sposoby borotby z nymy. *Medytsyna nevidkladnykh staniv*, no. 3(98), p. 32.
6. Yakovlieva L. V., Titova A. A. (2019) Doslidzhennia asortymentu hrupy likarskykh zasobiv NPZZ na farmatsevychnomu rynku v Ukraini za period 2014–2018 rokiv. *Farmatsevychnyi zhurnal*, no. 4, pp. 41–51.
7. Zhuravleva M. V., Kukes V. G., Prokofyev A. B. (2016) Ratsionalnoye primeniye NPVP – balans effektivnosti i bezopasnosti (obzor literatury). *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovaniy*, no. 6–4, pp. 687–696.

8. Moskal O. M., Lohai I. V., Turok Yu. Yu. (2019) Osoblyvosti proiaviv, likuvannia ta profilaktyky NPZP-indukovanoi hastroduodenopatii u khvorykh viddilenn riznogo profiliiu. *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho universytetu imeni V. N. Karazina*, no. 4, pp. 43–48.
9. Mirzoieva T. V. (2018) Analiz suchasnoho stanu vyrobnytstva likarskykh roslyn v Ukraini. *Klasychnyi pryvatnyi universytet*, vol. 6(11), pp. 62–67.
10. Bilai I. M., Ostapenko A. O., Krasko M. P., Bilai A. I. (2018) Eksperymentalne doslidzhennia fitopreparativ, yaki mistiat fenolni spoluky. *Naukovyi ohliad*, no. 7(50), p. 34–41.
11. Valchikhina O. Yu., Demina N. B., Nader A. (2016) Kornevishche imbirya kak perspektivnoye rastitelnoye syrye dlya sozdaniya lekarstvennykh sredstv. *Nauchno-proizvodstvennyi zhurnal «Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv»*, no. 4(17), pp. 1–16.
12. Rudnov V. A. (2006) Ot lokalnogo vospaleniya k sistemnomu: vykhod na novyye predstavleniya patogeneza kriticheskikh sostoyaniy i perspektivyterapii. *Intensivnaya terapiya*, t. 3, no. 1, pp. 5–8.
13. Litvitskiy P. F. (2003) Patofiziologiya. 2 izd. Moskva: GEOTAR MED, t. 1, 752 p.
14. Kryzhanovskiy G. N. (2002) Dizregulyatsionnaya patologiya: ruk. dlya vrachey i biologov. Moskva: Meditsina, 632 p.
15. Shukla Y., Singh M. (2007) Cancer preventive properties of ginger: a brief review. *Food Chemistry Toxicology*, no. 45(5), pp. 683–690.
16. Bhattarai S., Tran V. H., Duke C. C. (2001) The stability of gingerol and shogaol in aqueous solutions. *J. Pharm. Sci.*, pp. 1658–1664.
17. Puengphan C., Sirichote A. (2008) [6]-gingerol content and bioactive properties of ginger (Zingiber officinale Roscoe) extracts from supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Asian Journal of Food Agro-Industry*, no. 1(1), pp. 29–36.
18. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Specific Purposes, Strasbourg, Council of Europe. 1986, no. 123, p. 51.
19. Ivanova L. A. (2008) Tekhnologiya lekarstvennykh form: uchebnik v 2-kh t. Moskva: Meditsina, 544 p.
20. Taylor-Clark T. E. (2008) Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4oxononenal. *J Physiol.*, vol. 586, no. 14, pp. 3447–3459.
21. Trevisan G. (2014) TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout. *Free Radic Biol Med.*, vol. 72, pp. 200–209.
22. Andersson D. A. (2008) Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci.*, vol. 28, no. 10, pp. 2485–2494.
23. Wang Y. Y. (2008) The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *J Biol Chem.*, vol. 283, no. 47, pp. 32691–32703.
24. Kamyshnikov V. S. (2004) Spravochnik po kliniko-biokhimiicheskim issledovaniyam i laboratornoy diagnostike. Izd. 2-oye. pererabotannoye i dopolnennoye. Moskva: MEDpress-inform, 920 p.
25. Trukhacheva N. V. (2013) Matematicheskaya statistika v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s primeneniyem paketa Statistica. Minsk: GEOTARMedia, 377 p.