

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Критическая оценка эффективности ряда гомеопатических средств: плацебо эффект в биологии и клинике

УДК 615.015.32:615.039

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ01	Боткина Ольга Юрьевна		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Плотников Е. В.	К.Х.Н.		

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН	Маланина В. А.	К.Э.Н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОИЯ	Зяблова Н.Н.	К.Ф.Н.		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП 18.04.01 Химическая технология	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Пестряков А.Н.	Д.Х.Н.		

Томск – 2022 г.

**Планируемые результаты освоения ООП
«Перспективные химические и биомедицинские технологии»**

Код компетенции	Наименование компетенции
Общекультурные (универсальные) компетенции	
УК(У)-1	Способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, выработать стратегию действий
УК(У)-2	Способен управлять проектом на всех этапах его жизненного цикла
УК(У)-3	Способен организовывать и руководить работой команды, выработывая командную стратегию для достижения поставленной цели
УК(У)-4	Способен применять современные коммуникативные технологии, в том числе на иностранном (-ых) языках (-ах), для академического и профессионального взаимодействия
УК(У)-5	Способен анализировать и учитывать разнообразие культур в процессе межкультурного взаимодействия
УК(У)-6	Способен определить и реализовывать приоритеты собственной деятельности и способы ее совершенствования на основе самооценки
Общепрофессиональные компетенции	
ОПК(У)-1	Готовность к коммуникации в устной и письменной формах на русском и иностранном языках для решения задач профессиональной деятельности;
ОПК(У)-2	Готовность руководить коллективом в сфере своей профессиональной деятельности, толерантно воспринимая социальные, этнические, конфессиональные и культурные различия;
ОПК(У)-3	Способность к профессиональной эксплуатации современного оборудования и приборов в соответствии с направлением и профилем подготовки
ОПК(У)-4	Готовность к использованию методов математического моделирования материалов и технологических процессов, к теоретическому анализу и экспериментальной проверке теоретических гипотез;
ОПК(У)-5	Готовность к защите объектов интеллектуальной собственности и коммерциализации прав на объекты интеллектуальной собственности
Профессиональные компетенции выпускников	
ПК(У)-1	Способность организовывать самостоятельную и коллективную научно-исследовательскую работу, разрабатывать планы и программы проведения научных исследований и технических разработок, разрабатывать задания для исполнителей
ПК(У)-2	Готовность к поиску, обработке, анализу и систематизации научно-технической информации по теме исследования, выбору методик и средств решения задачи
ПК(У)-3	Способность использовать современные приборы и методики, организовывать проведение экспериментов и испытаний, проводить их обработку и анализировать их результаты
ПК(У)-18	Способность и готовность к созданию новых экспериментальных установок для проведения лабораторных практикумов

ПК(У)-19	Готовность к разработке учебно-методической документации для реализации образовательных программ
ДПК(У)-1	Готовность к созданию химических соединений, материалов и изделий биомедицинского назначения и (или) их физико-химического анализа с учетом требований охраны здоровья и безопасности труда, защиты окружающей среды.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное образовательное учреждение
 высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
 ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий
 Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология

УТВЕРЖДАЮ:
 Руководитель ООП
 18.04.01 Химическая технология
 _____ А.Н. Пестряков
 14.03.2022 г.

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

магистерской диссертации

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ01	Боткиной Ольге Юрьевне

Тема работы:

Критическая оценка эффективности ряда гомеопатических средств: плацебо эффект в биологии и клинике

Утверждена приказом директора (дата, номер)	55-51/с от 24.02.2022г
---	------------------------

Срок сдачи студентом выполненной работы:	10.06.2022 г.
--	---------------

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

<p>Исходные данные к работе</p> <p><i>(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).</i></p>	<p>Объект исследования – гомеопатические лекарственные средства: <i>Hydrastis, Conium, Phosphor, Carcinosinum, Thuja</i> в разведениях 3С-1000С. Исследование проводилось с использованием моделей <i>in vitro</i> - клеточных культур <i>Jurkat, MDA MB 231</i> и <i>РС-3</i>.</p>
<p>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</p> <p><i>(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной</i></p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Литературный обзор 2. Экспериментальная часть 3. Результаты и обсуждение 4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение 5. Социальная ответственность 6. Заключение

<i>работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).</i>	
Перечень графического материала <i>(с точным указанием обязательных чертежей)</i>	Графическое представление полученных результатов
Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы <i>(с указанием разделов)</i>	
Раздел	Консультант
Социальная ответственность	Федорчук Ю. М., профессор ООД
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Маланина В. А., доцент ОСГН
Раздел ВКР на иностранном языке	Зяблова Н.Н., доцент ОИЯ
Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках: Литературный обзор	

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	14.03.2022 г.
---	---------------

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Плотников Е.В.	к.х.н.		14.03.2022 г.

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ01	Боткина Ольга Юрьевна		14.03.2022 г.

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСООБЪЕКТИВНОСТЬ И
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ01	Боткиной Ольге Юрьевне

Школа	ИШХБМТ	Отделение (НОЦ)	-
Уровень образования	Магистратура	Направление/ специальность	18.04.01 Химическая технология

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих	Бюджет проекта – не более 600000 руб., в т.ч. затраты по оплате труда – не более 124000 руб.
2. Нормы и нормативы расходования ресурсов	Значение показателя интегральной ресурсоэффективности – не менее 4,1 баллов из 5,0.
3. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования	1. Налоговый кодекс Российской Федерации 2. ФЗ №212 от 24.07.2009 в ред. от 19.12.2016

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ	Определение потенциальных потребителей результатов исследования, анализ конкурентных технических решений.
2. Разработка устава научно-технического проекта	Определение целей и результатов проекта, организационной структуры проекта.
3. Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок	Формирование плана и графика проекта: - Определение структур работ; - Определение трудоемкости работ; - Разработка диаграммы Ганта. Формирование бюджета затрат проекта.
4. Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности	Расчет показателей сравнительной эффективности проекта, интегрального показателя эффективности

Перечень графического материала

1. «Портрет» потребителя результатов НТИ
2. Сегментирование рынка
3. Оценка конкурентоспособности технических решений
4. Матрица SWOT
5. График проведения и бюджет НТИ
6. Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НТИ

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	26.03.2022
--	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент ОСГН ШБИП	Маланина Вероника Анатольевна	к.э.н.		14.03.2022

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ01	Боткина Ольга Юрьевна		14.03.2022

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»**

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ01	Боткиной Ольге Юрьевне

Школа	ИШХБМТ	Отделение (НОЦ)	-
Уровень образования	Магистратура	Направление/ специальность	18.04.01 Химическая технология

Тема дипломной работы: «Критическая оценка эффективности ряда гомеопатических средств: плацебо эффект в биологии и клинике»

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:	
<p>1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения</p>	<p>Объект исследования – гомеопатические лекарственные средства; клеточные культуры <i>Jurkat, MDA MB 231</i> и <i>PC-3</i>.</p> <p>Рабочая зона – лаборатория клеточных исследований Научного парка Томского политехнического университета.</p> <p>Область применения – медицина, клеточная биология.</p>
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
<p>1. Производственная безопасность</p> <p>1.1. Анализ выявленных вредных факторов</p> <ul style="list-style-type: none"> • Природа воздействия • Действие на организм человека • Нормы воздействия и нормативные документы (для вредных факторов) • Средства защиты коллективные и индивидуальные <p>1.2. Анализ выявленных опасных факторов:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Термические источники опасности • Электроопасность • Пожароопасности 	<p>1. Вредные факторы:</p> <p>1.1 Недостаточная освещенность; Проведен расчет освещения рабочего места; представлен рисунок размещения светильников на потолке с размерами в системе СИ;</p> <p>1.2 Нарушения микроклимата, оптимальные и допустимые параметры;</p> <p>1.3 Шум, ПДУ, СКЗ, СИЗ;</p> <p>1.4. Наличие токсикантов, ПДК, класс опасности, СКЗ, СИЗ;</p> <p>2. Опасные факторы:</p> <p>2.1 Электроопасность; класс электроопасности помещения, безопасные номиналы I, U, R_{заземления}, СКЗ, СИЗ;</p> <p>2.2 Пожароопасность, категория пожароопасности помещения, марки огнетушителей, их назначение и ограничения применения;</p> <p>Приведена схема эвакуации.</p>
<p>2. Экологическая безопасность:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Выбросы в окружающую среду • Решения по обеспечению экологической безопасности 	<p>Наличие промышленных отходов (бумага-черновики, вторцвет- и чермет, пластмасса, перегоревшие люминесцентные лампы, оргтехника) и способы их утилизации.</p>
<p>3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:</p>	<p>Рассмотрены 2 ситуации ЧС:</p>

<ul style="list-style-type: none"> • перечень возможных ЧС при разработке и эксплуатации проектируемого решения; • разработка превентивных мер по предупреждению ЧС; • разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий. 	<p>1) природная – сильные морозы зимой (аварии на электро-, тепло-коммуникациях, водоканале, транспорте);</p> <p>2) техногенная – террористические акты; представлены мероприятия по обеспечению устойчивой работы производства в том и другом случае.</p>
4. Перечень нормативно-технической документации.	ГОСТы, СанПиНы, СНиПы
Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	
26.03.2022	

Задание выдал консультант по разделу «Социальная ответственность»:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор ООД	Федорчук Юрий Митрофанович	Д.т.н., профессор		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ01	Боткина Ольга Юрьевна		

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное образовательное учреждение
 высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
 ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий
 Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология
 Уровень образования магистратура
 Период выполнения весенний семестр 2021/2022 учебного года

Форма представления работы:

магистерская диссертация

**КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН
 выполнения выпускной квалификационной работы**

Срок сдачи студентом выполненной работы:	10.06.2022 г.
--	---------------

Дата контроля	Название раздела (модуля) / вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
21.03.2022 г.	Разработка раздела «Введение»	10
04.04.2022 г.	Разработка раздела «Литературный обзор»	10
18.04.2022 г.	Разработка раздела «Экспериментальная часть»	10
10.05.2022 г.	Разработка разделов «Результаты проведенного исследования (разработки)»	10
24.05.2022 г.	Разработка разделов «Социальная ответственность» и «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»	10
06.06.2022 г.	Оформление ВКР	10
14.06.2022 г.	Представление ВКР	40

Составил преподаватель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Плотников Е.В.	к.х.н.		14.03.2022

СОГЛАСОВАНО:

Руководитель ООП 18.04.01 Химическая технология	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Пестряков А.Н.	д.х.н.		12.03.2022

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 120 с., 15 рис., 23табл., 67 источников, 1 прил.

Ключевые слова: клеточные культуры, цитотоксичность, плацебо эффект, гомеопатические препараты.

Объектом исследования является (ются)

Гомеопатические препараты Желтокорень (*Hydrastis canadensis*), Болиголов (*Conium maculatum*), Карцинозинум (*Carcinosinum*) в различных разведениях.

Целью работы стало оценка биологического действия ряда гомеопатических препаратов на культуры раковых клеток. Задачи по изучению биологической активности гомеопатических препаратов на различных опухолевых клеточных культурах дополнены критической оценкой сравнительной эффективности исследований *in vitro* и клинических данных.

В процессе исследования проводился широкий спектр оценки биологической активности исследуемых препаратов на опухолевых клеточных линиях рака молочной железы, рака простаты, лимфобластного лейкоза и других.

В результате исследования проведено объективное тестирование гомеопатических препаратов на клеточных культурах. Проведен критический анализ результатов и обобщены имеющиеся данные по эффективности и механизмам действия гомеопатии. Исследована биологическая активность выбранных гомеопатических препаратов *in vitro* и сделан анализ клинической эффективности аналогичных препаратов в гомеопатической практике. Результаты обработаны и представлены с использованием статистических методов. Полученные данные позволили выявить отсутствие значимого эффекта гомеопатических препаратов на тестовых культурах в контролируемых условиях. Это вероятно подтверждает, что эффективность гомеопатии лежит в области психологии и плацебо эффекта.

Основные конструктивные, технологические и технико-эксплуатационные характеристики: В ходе работы применен научный подход к исследованию методов альтернативной медицины, с использованием широкого набора биологических методов исследования и различных клеточных культур.

Степень внедрения: Ведется НИР.

Область применения: фармакология, медицина, клеточная биология.

Экономическая эффективность/значимость работы

В результате работы объективными методами показано отсутствие эффекта гомеопатических препаратов на клеточных моделях *in vitro*. Результаты работы имеют высокое научное и социальное значение, в том числе вносят вклад в изучение новых направлений фармакологии малых доз и борьбу со лженаучными подходами в медицине.

Список принятых сокращений и обозначений

ГЛС – гомеопатическое лекарственное средство

РКИ – рандомизированные контролируемые исследования

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

PBS – натрий-фосфатный буфер

DMEM – модификация Дюльбекко среды Игла

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида

Оглавление

Введение.....	15
1. Литературный обзор	17
1.1 Основные принципы гомеопатии	17
1.2 Проблемы гомеопатии	19
1.3 Современное законодательство в области гомеопатии	20
1.4 Исследования эффективности гомеопатических лекарств.....	21
1.5 Возможные механизмы действия ГЛС.....	22
1.6 Цитотоксичность и методы ее анализа	24
1.6.1 МТТ-тест	27
1.6.2 Резазуриновый тест.....	29
1.6.3 Проточная цитофлуориметрия.....	30
2 Экспериментальная часть.....	33
2.1 Материалы и методы	33
2.1.1 Исследуемые гомеопатические препараты.....	33
2.1.2 Культуры клеток.....	34
2.1.3 Обработка клеток	35
2.1.4 Оценка цитотоксичности ГЛС	35
2.1.5 Оценка уровня апоптоза и варианта клеточной гибели методом проточной цитофлуориметрии.....	37
2.1.6 Статистическая обработка.....	38
3 Результаты и обсуждение	38
4 Анализ применения ГЛС в клинической практике	46
5 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	54
5.1 Предпроектный анализ	54
5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования.....	54
5.1.2 Анализ конкурентных технических решений	55
5.1.3 SWOT-анализ.....	57
5.2 Планирование научно исследовательских работ	59
5.2.1 Структура работ в рамках научного исследования.....	59
5.2.2 Определение трудоемкости выполнения работ.....	61
5.2.3 Разработка графика проведения научного исследования.....	61
5.2.4 Бюджет научно-технического исследования.....	66
6 Социальная ответственность.....	75
6.1 Производственная безопасность.....	76
6.1.1 Анализ выявленных вредных факторов.....	76

6.1.1.1 Недостаточная освещенность.....	77
6.1.1.2 Отклонение показателей микроклимата в помещении.....	81
6.1.1.3 Превышение уровня шума.....	83
6.1.1.4 Защита от токсикантов.....	84
Работа с вредными веществами	84
Работа с клеточными культурами.....	85
6.1.2 Анализ выявленных опасных факторов.....	87
6.1.2.1 Поражение электрическим током.....	87
6.1.2.2 Пожарная безопасность	89
6.2 Экологическая безопасность.....	92
6.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях	94
Заключение	98
Список используемых источников	99
Приложение А	106

Введение

«-Дорогой Степан Богданович, - заговорил посетитель, пронизательно улыбаясь, - никакой пирамидон вам не поможет. Следуйте старому мудрому правилу – лечить подобное подобным. Единственно, что вернет вас к жизни, это две стопки водки с острой и горячей закуской».

М.Булгаков «Мастер и Маргарита»

В последнее время во многих странах мира наблюдается рост интереса к альтернативным (комплементарным) методам лечения, в число которых входит и гомеопатия [1,2]. Отчасти это обусловлено недостаточной эффективностью конвенциональной медицины - прежде всего, в отношении хронических заболеваний, среди которых достаточно распространенным является рак. Стоит отметить, что общепринятые методы лечения опухолевых заболеваний (в частности, химиотерапия и лучевая терапия) имеют множество недостатков, включая высокую токсичность, нарушение структуры и функции органов и тканей, появление резистентности и т.д. Поэтому поиск оптимальных, с точки зрения эффективности и безопасности, методов лечения (как самих онкологических заболеваний, так и нежелательных явлений, связанных с побочным действием терапии), а также - профилактики возникновения рецидивов заболевания и улучшения качества жизни пациента в целом, является крайне актуальной задачей, для решения которой необходимо использовать все возможные подходы. В этом контексте интересно рассмотреть гомеопатические препараты, которые могут применяться в качестве комплементарных у пациентов с различными заболеваниями, в т.ч. онкопатологией.

Однако имеющиеся научные данные об эффективности гомеопатии недостаточны и противоречивы: одни исследования подтверждают наличие эффекта от гомеопатии, в т.ч. у онкологических больных [3,4], в то время как другие - опровергают, приравнивая действие гомеопатии к эффекту плацебо [5,6,7].

Несмотря на предпринимаемые попытки объяснить механизмы действия гомеопатических лекарств на живые организмы [8,9], выдвигаемые гипотезы не выглядят достаточно убедительными и требуют дальнейшей проверки.

Таким образом, целью настоящей работы явилась оценка биологического действия ряда гомеопатических препаратов на культуры раковых клеток. Для достижения поставленной цели нами были сформулированы следующие задачи:

1. Провести критический анализ и обобщить имеющиеся данные по эффективности и механизмам действия гомеопатии;
2. Исследовать биологическую активность выбранных гомеопатических препаратов *in vitro*;
3. Провести анализ клинической эффективности аналогичных препаратов в гомеопатической практике.

1. Литературный обзор

1.1 Основные принципы гомеопатии

Более 200 лет назад С. Ганеман предложил гомеопатический метод лечения, до сих пор пользующийся популярностью во всем мире. Отдельного внимания заслуживают философские аспекты гомеопатии. Согласно представлениям Ганемана, человек, помимо материального тела, наделен некоей духовной жизненной силой (нематериальной сущностью). В здоровом состоянии она одушевляет организм и сохраняет гармоничную жизнедеятельность «таким образом, что наш вечный, наделенный рассудком дух может свободно распоряжаться этим живым, здоровым инструментом для высших целей нашего существования» [10]. Причины болезней, по Ганеману, не материальны (что перекликается с концепцией биопсихосоциальной модели развития болезней Джорджа Энгеля [11] и основными постулатами психосоматики - современного направления в медицинской психологии [12]). В §16 «Органа врача-искусства» он пишет, что только благодаря духовным влияниям патогенных агентов заболевает наша духовная жизненная сила и, сходным образом, только духовное (динамическое) воздействие лекарств может снова восстановить здоровье. Расстройство жизненной силы обнаруживает себя совокупностью симптомов, исходя из которой, врач-гомеопат подбирает подходящий (подобный) препарат. Каждый препарат предварительно должен проходить испытания (прувинги) на здоровых людях – для понимания особенностей присущих ему эффектов (характерных для него симптомов).

Препараты, прошедшие прувинги, с подробным их описанием, внесены Ганеманом и его последователями в «Materia Medica». Для выбора наиболее подобного пациенту препарата врач-гомеопат проводит опрос (сбор анамнеза), осмотр, объективное исследование пациента, после чего все собранные симптомы «переводит» на язык «Репертория» (сборник симптомов, классифицированных по рубрикам, с перечнем соответствующих им

препаратов). Препарат, «закрывающий» большинство симптомов, является наиболее подобным и назначается пациенту.

Для того чтобы добиться излечения болезни, согласно Ганеману, необходимо лишь устранить совокупность симптомов, которые порождаются пораженной жизненной силой. После исчезновения всей (!) совокупности симптомов, поражение жизненной силы, иначе говоря, внутреннее и наружное болезненное состояние в целом, также устраняется [10]. Назначение по одному (нескольким симптомам) «не только не позволяли достичь каких-либо полезных результатов, но и приносили много вреда. Единичный симптом в такой же степени является всем заболеванием, в какой нога – человеком» [10].

Назначенный (подобный) препарат, по Ганеману, создает в организме искусственную болезнь, сходную по симптомам с имеющейся у пациента, но наделенную большей силой. «Более слабое динамическое поражение навсегда уничтожается в живом организме более сильным, если последнее (отличаясь по своей природе) чрезвычайно подобно первому в своих проявлениях» [10].

Таким образом, можно выделить основные принципы гомеопатии:

а) принцип подобия (*similia similibus curantur*): совокупность симптомов пациента должна иметь максимальную схожесть с симптомами назначенного препарата, описанными для него в «Materia Medica»;

б) принцип малой дозы (многократного разведения);

в) принцип потенцирования (динамизации, или последовательных встряхиваний раствора при каждом разведении);

г) принцип испытания препарата (прувинг): тестирование гомеопатического средства на здоровых людях с последующим анализом возникающих у них симптомов – с целью определения наиболее характерных из них для данного средства.

Лишь препарат, изготовленный с соблюдением всех этих принципов, по Ганеману, может считаться гомеопатическим.

1.2 Проблемы гомеопатии

Исследования, проводимые в области гомеопатии, имеют свои трудности: во-первых, нет единой системы образования в гомеопатии, в то же время существуют разные школы, многие из которых не следуют в точности принципам, сформулированным основоположником гомеопатии С. Ганеманом, пропагандируя свое видение и внося свои модификации; во-вторых, далеко не все сильно разведенные вещества можно отнести к гомеопатии, для этого они должны быть подвергнуты динамизации и прувингу; в-третьих, нет общепринятых протоколов исследования, что затрудняет проведение сравнительного анализа испытаний, описанных разными авторами, в-четвертых, ученый – исследователь, часто сам не являясь гомеопатом, далек от представления о правильном назначении ГЛС, в пятых, ГЛС будет эффективным лишь при условии соблюдения принципа подобия, то есть, оно должно быть максимально точно подобрано в соответствии с симптомами конкретного пациента (что требует высокой квалификации врача-гомеопата).

Также не стоит забывать, что для успешного излечения хронической патологии одного ГЛС обычно не достаточно, требуется последовательное назначение нескольких препаратов (в нарастающих разведениях – по шкале Кента), каждый из которых будет являться наиболее подходящим для пациента (в результате проведенной реперторизации симптомов) на определенном временном интервале и сыграет свою важную роль в конечном результате. Все перечисленные выше проблемы часто затрудняют правильную интерпретацию данных, полученных в гомеопатических исследованиях.

1.3 Современное законодательство в области гомеопатии

Использование гомеопатического метода лечения разрешено российским законодательством, является законодательно обоснованным и регулируется Приказом Министерства здравоохранения и медицинской промышленности РФ N 335 от 29.11.95 «Об использовании метода гомеопатии в практическом здравоохранении».

Правила сертификации, производства ГЛС регулируются Федеральным законом РФ от 22.06.98г №86-ФЗ «О лекарственных средствах», Государственным реестром лекарственных средств (ежегодное издание), Общими фармакопейными статьями и фармакопейными статьями предприятий на сырье, гомеопатические матричные настойки и ЛС.

Медицинские специалисты используют исключительно те гомеопатические препараты, применение которых одобрено российским Министерством здравоохранения и имеют статус лекарственного средства.

В апреле 2017 г Генеральной прокуратурой РФ были проанализированы нормативные правовые акты в сфере охраны здоровья и обращения лекарственных средств, регулирующие вопросы применения гомеопатических методов лечения. Результаты показали, что действующие нормативные акты в рассматриваемой сфере позволяют использовать гомеопатический метод лечения в практической медицине.

В ответе надзорного ведомства также отмечается, что меморандум, принятый комиссией по лженауке, не является обязательным к исполнению. «Принятый Комиссией по борьбе с лженаукой и фальсификаций научных исследований при президиуме РАН Меморандум №2 «О лженаучности гомеопатии», не является нормативным актом, обязательным к исполнению. Положения меморандума носят рекомендательный характер, где изложена позиция

отдельных ученых», - написано в официальном ответе Генеральной прокуратуры.

1.4 Исследования эффективности гомеопатических лекарств

В имеющейся на сегодняшний день научной литературе можно найти данные как подтверждающие эффективность гомеопатического метода лечения [5,6], так и утверждающие, что клинические эффекты гомеопатии являются не более чем эффектами плацебо [7,8,9].

Авторы трех всесторонних обзоров гомеопатических РКИ, отражающих широкий спектр клинических состояний, пришли к осторожному выводу, что гомеопатическое вмешательство, вероятно, отличается от плацебо [13,14,15] .

Результаты мета-анализа [16] также не подтвердили гипотезу о том, что клинические эффекты гомеопатии полностью обусловлены плацебо.

В работе [5] были найдены «слабые доказательства специфического эффекта гомеопатических средств совместимых с представлением о том, что клинические эффекты гомеопатии являются эффектами плацебо».

Однако во всех вышеупомянутых обзорах анализировались результаты РКИ, где гомеопатия назначалась индивидуально, совместно с результатами исследований, в которых имели место неиндивидуализированные гомеопатические назначения (где все исследуемые, не зависимо от разнообразия имеющихся у них симптомов в рамках одной нозологии, получали одно и то же гомеопатическое средство). Очевидно, что такая неоднородность может привести к искажению результатов.

В мета-анализе [17], где изучались лишь РКИ с неиндивидуализированными гомеопатическими назначениями, отмечено в целом низкое качество исследований, отчего страдает надежность оценки эффекта лечения. Полученные в данной работе результаты не позволяют

отвергнуть нулевую гипотезу о том, что эффект от лечения с использованием неиндивидуализированных гомеопатических препаратов неотличим от эффекта плацебо.

Было также проведено два систематических обзора с метаанализом РКИ, где гомеопатические препараты назначались индивидуально: в 1998 году [18] и в 2014 году [19]. В последнем отмечается небольшой статистически значимый эффект от индивидуального гомеопатического лечения. Также авторы заключают, что для повышения уровня доказательности и четкости интерпретации данных необходимы новые РКИ высокого качества.

В целом анализ научной литературы в области гомеопатии показал, что под общим словом «гомеопатия» понимаются как монопрепараты, так и комплексные препараты, включающие в состав несколько ГЛС [20], в то время как, следуя логике С. Ганемана, подобным может быть лишь одно лекарство [10].

Тем не менее, некоторые исследования комплексных гомеопатических препаратов говорят об их эффективности у людей [21,22] и животных [23], тогда как другие – об эффекте, сравнимом с плацебо [24,25].

1.5 Возможные механизмы действия ГЛС

Отсутствие хотя бы одной молекулы вещества в гомеопатических препаратах в разведениях 12С и выше для многих ученых является основанием для отрицания возможности какого-либо их действия на живые организмы. В то время как другие исследователи на основании накопленных данных и наблюдаемых закономерностей выдвигают различные гипотезы относительно механизмов действия ГЛС.

С точки зрения С. Ганемана, механизмы действия гомеопатических лекарств не могут быть объяснены с помощью химии, физики или математики, т.к. «вещества, которые используются как лекарства, постольку являются

лекарствами, поскольку обладают каждое своей собственной специфической энергией изменять состояние человека посредством динамического, духовного, воспринимаемого чувствительными нервными волокнами влияниями на духовный, управляющий функциями организма, жизненный принцип» [10]. Но стоит принимать во внимание, что Ганеман жил более двух веков назад, и с тех пор научные методы исследования претерпели существенные изменения.

Так, группа ученых из Индии показала в своем исследовании с использованием трансмиссионной электронной микроскопии, что гомеопатические разведения *Aurum metallicum* и *Cuprum 30C* и *200C* содержат наночастицы [26], что могло бы объяснить их биологические эффекты. Имеются также сообщения ряда исследователей об отличии физико-химических свойств сильно разбавленных растворов от свойств чистой неочищенной воды, несмотря на идентичный химический состав двух жидкостей [27-30]. В научной работе [31] был замечен следующий парадокс: размер кластеров фуллеренового циклодекстрина, β -циклодекстрина, хлорида натрия, гуанозинмонофосфата натрия и ДНК-олигонуклеотида увеличивался с уменьшением концентрации растворов. Возможно, изучение явлений кластерно-кластерной агрегации в водных растворах различных веществ позволит в будущем раскрыть механизмы действия гомеопатических препаратов.

Однако, несмотря на эти данные и данные литературы, свидетельствующие об улучшении клинических показателей у больных [3,4,32], изменении количества биологически активных веществ в организме (например, печеночных трансаминаз) [33], а также влияние на экспрессию генов [34,35] в ответ на гомеопатическое воздействие, до сих пор нет четкого понимания и подтвержденных механизмов влияния гомеопатии на живые организмы.

В первичных исследованиях клеточные модели *in vitro* широко используются для оценки прямого цитотоксического действия различных веществ. Публикаций, посвященных изучению цитотоксичности гомеопатических препаратов в отношении культур клеток, в частности клеток рака почки, толстой кишки и молочной железы, немного [36,37,38]. Так, в работе [38] показано цитотоксическое действие гомеопатического препарата *Hydrastis* на клетки MCF-7 гормонозависимого рака молочной железы.

1.6 Цитотоксичность и методы ее анализа

Цитотоксичность – это способность физических, химических или биологических факторов вызывать патологические изменения в клетке, в результате чего нарушается клеточный цикл, либо клетка гибнет [39,40]. Не останавливаясь подробно на описании всех возможных путей гибели клеток [41], можно выделить два основных - некроз и апоптоз [42,43].

Апоптоз - запрограммированная гибель клетки, в процессе которой происходит ее фрагментация на отдельные апоптотические тельца, которые ограничены плазмолеммой. Апоптотические тельца фагоцитируются макрофагами либо соседними клетками без развития воспалительной реакции, такой процесс называется эффероцитоз. При апоптозе он заключается в том, что мертвые клетки удаляются до того, как нарушается целостность их мембраны и их содержимое может попасть в окружающие ткани. Таким образом, повреждения окружающих клеток под воздействием ферментов, окислителей, медиаторов воспаления и других внутриклеточных компонентов не происходит, и вокруг погибших клеток не образуется зоны воспаления.

Апоптоз, в зависимости от путей развития, может быть: внешний - осуществляемый через поверхностные рецепторы клеточной гибели - и внутренний - проходящий через цепь митохондриальных реакций [44]. Первый характерен для физиологического гистогенеза тканей, а второй связан с повреждением митохондрий при патологии. Апоптоз играет важную роль

для организма в целом, поддерживая клеточный гомеостаз, удаляя генетически дефектные клетки и обеспечивая тем самым правильное соотношение численности разных видов клеток [45]. Внутренний путь апоптоза развивается вследствие внутриклеточных «стрессов»: воздействия активных форм кислорода, повреждения ДНК, цитозольной перегрузки Ca²⁺ и т.д., в результате чего нарушается целостность митохондриальных мембран (в первую очередь – наружной), либо происходит открытие высокопроницаемых ионных каналов. Поврежденные органеллы компарментализируются, формируя апоптотические тельца, которые в дальнейшем фагоцитируются.

Некроз - патологическое состояние, для которого характерны необратимые изменения в ткани с разрушением её клеток при условии сохранения жизнеспособности организма в целом. Необходимо отметить, что морфологические проявления некроза на светооптическом уровне - кариопикноз, кариорексис, кариолизис, аутолиз - проявляются после наступления собственно гибели клетки через несколько десятков часов и даже суток.

Инициация данного вида клеточной гибели происходит в результате воздействия экстремальных и интенсивных факторов в течение времени, достаточного для формирования необратимых изменений (нарушения целостности мембранных структур клетки - митохондриальных мембран, плазмалеммы, кариолеммы). Разрыв мембран считается достоверным признаком некроза.

Некротизированные клетки подвергаются аутолизу - разрушению под действием внутриклеточных протеолитических ферментов. Некроз обычно сопровождается развитием воспаления (чаще экссудативного) [46].

Для определения цитотоксичности веществ используются различные тесты *in vitro*, среди которых, в зависимости от механизма повреждения клеток, можно выделить 3 группы:

1. Определение повреждения плазматической мембраны:

а) Поглощение красителей:

- трипановый синий;
- пропидиум йодид (propidium iodide).

б) Высвобождение радиоактивных или флуоресцентных меток:

радиоактивные изотопы:

- [⁵¹Cr], [³H]- тимидин;
- [³H]-пролин;
- [³⁵S], [⁷⁵Se]- метионин;
- 5-[¹²⁵I]-2-дезоксидеокси-уридин;

флуоресцентные красители:

- флуоресцеин и его производные.

в) Выход цитоплазматических ферментов:

- лактатдегидрогеназа.

2. Определение метаболической активности:

а) Изменение энергетического обмена:

- соли тетразолия (МТТ, ХТТ, WST-1);
- резазурин и его производные (Alamar blue);
- нейтральный красный.

б) Нарушение гомеостаза внутриклеточного кальция:

- эфиры ацетоксиметила (Flou4 и др).

в) Активация свободно-радикальных процессов в клетке:

- индикаторы рН (флуоресцеин и его производные).

г) Синтез белков теплового шока.

3. Определение клеточной пролиферации:

а) Определение новых клеточных колоний (ST1);

б) Измерение уровня синтеза ДНК (радиоактивные метки);

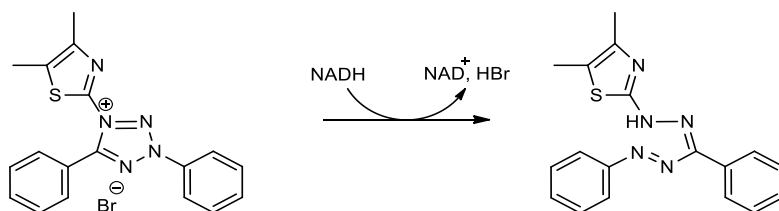
в) Измерение ферментов, регулирующих клеточный цикл (CDK – киназы).

Таким образом, критериями оценки цитотоксичности и подавления роста клеток в данных тестах являются: целостность клеточных мембран, активность митохондрий, клеточный метаболизм, синтез общего белка и пролиферация клеток.

Ниже подробнее остановимся на тестах, используемых нами в рамках данной работы для определения цитотоксической активности гомеопатических препаратов в отношении культур раковых клеток человека.

1.6.1 МТТ-тест

МТТ-тест – это метод колориметрического анализа, в основе которого лежит способность дегидрогеназ митохондрий живых клеток восстанавливать желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия (МТТ) в пурпурносиние кристаллы формазана, растворимые в ДМСО (рисунок 1). Метод находит широкое применение при оценке цитотоксичности различных веществ, а также – скрининге противоопухолевых препаратов [47].



МТТ (желтый)

МТТ-формазан (фиолетовый)

Рисунок 1 Реакция восстановления МТТ до МТТ-формазана

В ходе эксперимента после завершения необходимого периода культивирования культуральная среда во всех лунках заменяется средой, содержащей 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (реагент МТТ) при концентрации (0,45 мг/мл), затем 96-луночный микропланшет инкубируется в течение 4 часов при 37 ° С (5% CO₂, влажная атмосфера) до формирования отчетливых кристаллов формазана в контрольных клетках, после чего среда заменяется диметилсульфоксидом для растворения формазана. Образцы встряхиваются в течение 5 минут, оптическая плотность образцов измеряется при длине волны 570 нм (контрольные значения - при длине 620 нм) на спектрофотометре Multiscan FS (ThermoFisher). Жизнеспособность клеток рассчитывается как процент значения поглощения образца по сравнению с нормализованным значением поглощения контроля без воздействия соединения:

$$\text{Жизнеспособность клеток (\%)} = \frac{\Delta|(\text{образца})|}{\Delta|(\text{контроль+})|} \times 100\%,$$

где $\Delta\text{ABS}(\text{образца}) = \text{ABS}_{570}(\text{образца}) - \text{ABS}_{620}(\text{образца})$ – разность между средними значениями оптических плотностей исследуемых образцов при длинах волн 570 нм и 620 нм;

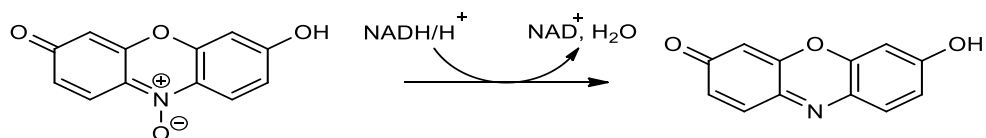
$\Delta\text{ABS}(\text{контроля+}) = \text{ABS}_{570}(\text{контроля+}) - \text{ABS}_{620}(\text{контроля+})$ - разность между средними значениями оптических плотностей контроля живых клеток при длинах волн 570 нм и 620 нм. Значения, выше контрольных, свидетельствуют о пролиферации клеток, а значения, более низкие относительно контрольных, - о гибели клеток.

К преимуществам данного метода можно отнести: возможность одновременного исследования большого количества образцов, невысокую стоимость, простоту получения данных, быстроту проведения эксперимента, относительно высокую чувствительность и воспроизводимость.

По сравнению с флуоресцентным анализом, чувствительность МТТ – теста ниже, особенно в случае низкой метаболической активности клеток. А такие вещества, как кофермент А, витамин А, полифенолы могут препятствовать восстановлению МТТ до кристаллов формазана. Сам же МТТ, как и кристаллы формазана, оказывают повреждающее действие на клетки, меняя их морфологию [48].

1.6.2 Резазуриновый тест

Резазурин - это окислительно-восстановительный краситель, который служит индикатором химической цитотоксичности в культуре клеток [49]. Оценка цитотоксичности с помощью резазурина связана с дыхательной активностью клеток. Снижение концентрации (окисление) красителя, свидетельствует о нарушениях в митохондриях и, как итог, снижении жизнеспособности клеток [50]. Резазуриновый тест основан на способности жизнеспособных, метаболически активных клеток восстанавливать голубой нефлуоресцирующий резазурин до розового флуоресцентного резорфина, который можно определить колориметрически или флуориметрически. Данный процесс происходит с участием внутриклеточных митохондриальных, микросомальных и цитозольных оксидоредуктаз [49,51]. Резазурин стабилен в культуральной среде и не является токсичным для клеток, что позволяет его не только для определения цитотоксичности, но также и для оценки пролиферации клеток *in vitro* [52]. Токсичные вещества, нарушающие жизнеспособность клеток и их пролиферацию, также влияют на способность клеток редуцировать резазурин. В работах [51,53] показано, что количество жизнеспособных клеток прямо пропорционально скорости редукции красителя. Резазурин также входит в состав различных наборов для определения цитотоксичности и жизнеспособности клеток, например, AlamarBlue, PrestoBlue (Invitrogen) и др.



Резазурин

Резорурфин

Синий цвет

Розовый цвет

Рисунок 2 Реакция преобразования резазурина до резорурфина

По сравнению с МТТ-тестом, резазурин восстанавливается более широким спектром ферментов: кроме митохондриальных дегидрогеназ его восстанавливают также цитохромы и дегидрогеназы, находящиеся в цитоплазме клетки. К преимуществам метода можно отнести его точность и быстроту измерения выживаемости и клеточной пролиферации [54].

1.6.3 Проточная цитофлуориметрия

Проточный цитофлуориметр – это прибор, позволяющий измерять оптические свойства отдельных клеток в суспензии, наличие последней необходимо, поскольку измерение производится в токе жидкости. Цитофлуориметрический метод анализа находит применение в иммунологии, онкологии, цитологии, фармакологии, гематологии, растениеводстве. Анализ полученных с помощью этого метода исследования данных позволяет выделить популяции клеток, обладающие теми или иными свойствами, а также определить их относительное и абсолютное содержание в образце.

В упрощенном виде работа проточной системы прибора представлена на рис. 1: суспензия клеток из пробирки с образцом забирается специальной иглой (1); клетки узкой струей впрыскиваются в центр ламинарного потока проточной жидкости, представляющей собой буферный раствор, изотоничный по отношению к клеткам (2); Забор образца из пробирки и проточной жидкости из соответствующего

резервуара осуществляется за счет подачи избыточного давления (3); поток жидкости с клетками протекает через проточную ячейку (4), где происходит измерение оптических свойств клеток; после прохождения проточной ячейки поток жидкости собирается в слив (5).

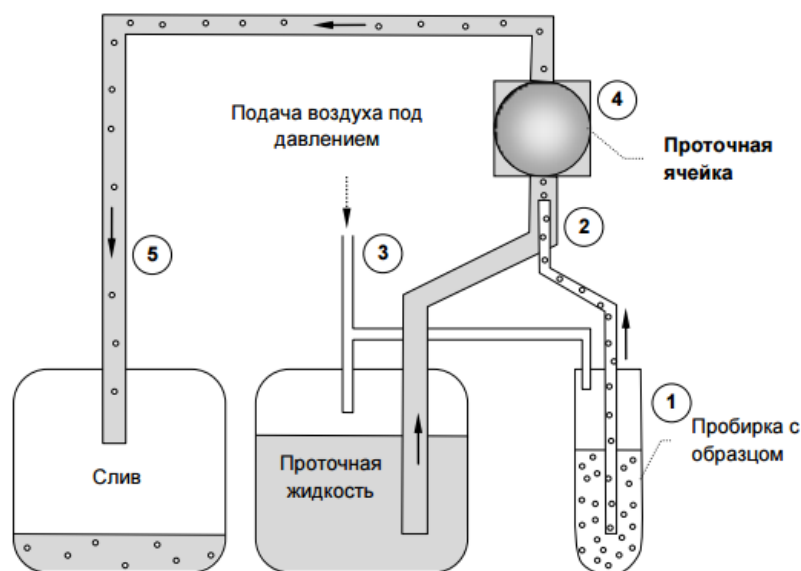


Рис. 1 - Принципиальная схема проточной системы цитофлуориметра

Оптические свойства клетки измеряются в проточной ячейке – ключевом элементе цитофлуориметра, - конструкция которой может отличаться у различных моделей цитометров.

Центрирование клеток в проточной ячейке осуществляется за счет гидродинамического фокусирования (строго организованного потока жидкости). Поэтому необходимо поддержание ламинарности потока, т.е. перемещение жидкости слоями/струями без их перемешивания. Суть в том, чтобы поток клеток в центре не смешивался с окружающей его проточной жидкостью. Увеличение давления проточной жидкости увеличивает точность измерения.

Оптическая система проточного цитофлуориметра состоит из одного или нескольких монохроматических лазерных источников света и системы детектирования сигнала. При прохождении клеткой лазерного

луча часть света рассеивается клеткой; часть энергии света поглощается и расходуется в тепло, на протекание фотохимических процессов, либо высвечивается в виде света (флуоресцирует); часть света проходит без изменения, не взаимодействуя с клеткой.

Одновременное использование нескольких красителей дает возможность выделить популяции клеток с различным сочетанием исследуемых признаков.

При выборе красителя необходимо учитывать, что длина волны хотя бы одного из лазерных источников должна попадать в спектр возбуждения красителя и что в системе детектирования сигнала должен быть хотя бы один канал FL, позволяющий принять сигнал флуоресценции красителя. При работе с двумя и более красителями нужно учитывать широту и возможность перекрытия между собой их спектров флуоресценции. Иначе это может привести к неправильной интерпретации полученных результатов. Для современных проточных цитофлуориметров существуют алгоритмы компенсации перекрытия спектров флуорофоров.

В настоящей работе использовался цитометр «CytoFlex» (Beckman Coulter, США), представленный на рисунке 2.

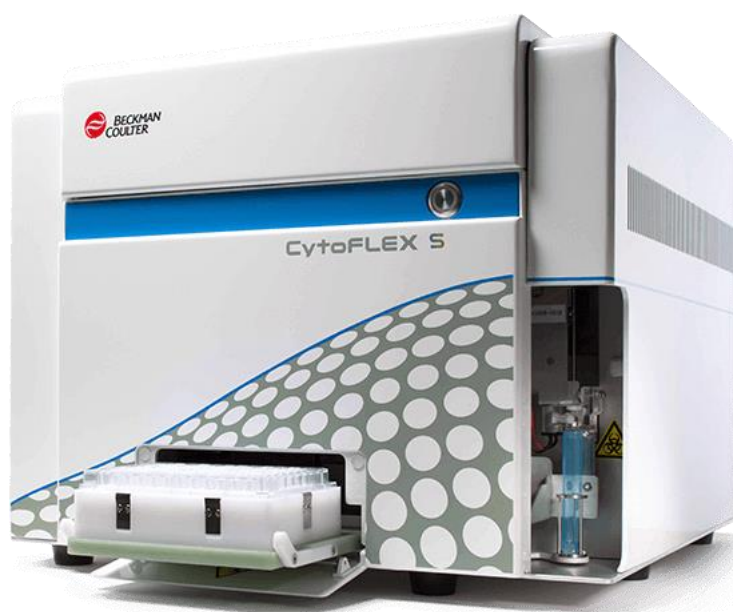


Рисунок 2 - цитометр «CytoFlex» (Beckman Coulter, США)

Исключительно высокая производительность этих приборов позволяет анализировать большие объемы данных, содержащие информацию о десятках и сотнях тысяч клеток.

2 Экспериментальная часть

2.1 Материалы и методы

2.1.1 Исследуемые гомеопатические препараты

Гомеопатические препараты были выбраны исходя из описанных в гомеопатической литературе случаев их применения при раке молочной железы и раке простаты [55,56], а также – данных научных исследований, говорящих о возможности их влияния на пролиферацию раковых клеток [57]. Таким образом, были взяты 2 препарата растительного происхождения: Желтокорень (*Hydrastis canadensis*) и Болиголов (*Conium maculatum*), а также - Карцинозинум (*Carcinosinum*) - нозод, полученный из клеток рака молочной железы.

Данные ГЛС были приготовлены в гомеопатической аптеке в соответствии со стандартами фармакопеи Российской Федерации - с помощью метода, основанного на адсорбции исходного разведения на гранулы. Данный метод заключается в нанесении жидкого гомеопатического разведения (3С, или 12С - в случае с *Carcinosinum*, и 1000С) активного компонента на вспомогательный компонент (гранулы, получаемые из лактозы). Для обеспечения равномерного распределения жидких гомеопатических разведений гранулы должны быть одинакового размера. В данном случае вес каждой гранулы составил 0,022 гр.

В стеклянную банку, объем которой должен быть в 1,5 или 2 раза более объема помещаемых гранул по весу, загружают гранулы из расчета 10,0 г соответствующего разведения лекарственного средства на 1 кг гранул, и добавляют столько же по массе 70 % спирта этилового (для более равномерного распределения и насыщения всей массы гранул). Закрыв банку крышкой (обернутой в пергаментную бумагу), немедленно начинают встряхивать банку (ручным способом) в течение 10 минут. По окончании

встряхивания гранулы из банки высыпают для сушки на деревянные (с отверстиями) щиты, покрытые пергаментной бумагой. Сушку гранул проводят воздушным способом до полного высыхания до постоянной массы в соответствии с технологическим регламентом. После чего гомеопатические гранулы упаковываются, маркируются с указанием наименования активного компонента на латинском языке, шкалы и степени разведения, а также - наименования вспомогательного вещества.

Для экспериментов с клетками образцы гомеопатических препаратов готовились следующим образом. В стерильный эппендорф помещался спиртовой раствор (96%этанол/вода в соотношении 1:2) и лактозный шарик с нанесенным на него гомеопатическим средством в определенном разведении, после чего их оставляли стоять несколько часов при комнатной температуре до полного растворения. Таким же образом готовили контрольные образцы, только вместо лактозного шарика с ГЛС помещали плацебо (лактозный шарик без ГЛС). Затем в соответствующие лунки с клетками добавляли по 1 мкл раствора гомеопатического препарата, либо контрольного (плацебо) раствора.

2.1.2 Культуры клеток

Для сравнительного исследования цитотоксического действия препаратов в качестве модельной системы *in vitro* использовали клеточные линии рака молочной железы человека (MDA-MB-231), рака простаты (PC-3), а также иммортализованную линию Т-лимфоцитов человека (Jurkat). Выбор первых двух линий был обусловлен тем, что они являются объективной клеточной моделью самых распространенных видов рака, занимающих ведущие позиции в смертности от онкологических заболеваний. Линия Jurkat является моделью Т-клеточного лейкоза человека и позволяет оценить действие препаратов на суспензионные клеточные системы (например, кровь, в системе *in vivo*). Адгезивные клеточные линии выращивались в среде DMEM (ПанЭко, Россия), а суспензионные клеточные линии выращивались в среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия). Оба варианта сред обогащались

добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS; One Shot™, Thermo Fisher Scientific, Brazil), глутамина (добавка GlutaMAX, Gibco, USA) и 1% антибиотика пенициллин-стрептомицина (penicillin/streptomycin mixture, Paneko, Russia). Культивированные клетки инкубировали с увлажненным CO₂ (5%) при 37 °C.

2.1.3 Обработка клеток

Клеточные линии, используемые в эксперименте, находились в экспоненциальной фазе роста после не менее 2 пассажей. Для оценки цитотоксического действия препаратов клеточные линии MDA-MB-231 и PC-3 заседали в отдельные 96-луночные планшеты в объеме 0,1 см³ клеточной суспензии на лунку (в конечной концентрации 5000 клеток в лунке). Далее проводили инкубацию в CO₂ – инкубаторе в течение 24 часов, для обеспечения клеточной адгезии к поверхности, адаптации клеток и начала нормального роста клеток. Клеточная линия Jurkat готовилась аналогично, но заседалась в концентрации 20 тыс. клеток в лунку. Затем в соответствующие лунки с клетками добавляли по 1 мкл раствора гомеопатического препарата, либо контрольного (плацебо) раствора. Планшет помещали в CO₂ – инкубатор. Спустя 48 часов оценивали цитотоксичность при помощи МТТ теста и проводили цитофлуориметрическое исследование жизнеспособности и вариантов клеточной гибели.

2.1.4 Оценка цитотоксичности ГЛС

Оценка цитотоксичности исследуемых препаратов проводилась с помощью стандартного МТТ-теста (резазуринового теста – в случае культуры клеток лимфобластного лейкоза – *Jurkat*), в основе которого лежит способность живых клеток восстанавливать желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза, растворимые в диметилсульфоксиде (ДМСО) (Рис. 3,4). После завершения необходимого периода культивирования культуральную среду во всех лунках заменяли средой, содержащей 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий

бромид (реагент МТТ) при концентрации 0,45 мг / мл. Затем планшеты культивировали еще в течение 4 часов (5% CO₂, 37 ° С) до формирования отчетливых кристаллов формазана в контрольных клетках, после чего среду заменяли диметилсульфоксидом для растворения формазана. Образцы встряхивали в течение 5 минут, и оптическую плотность образцов измеряли при длине волны 570 нм (контрольные значения измеряли при длине 620 нм) на спектрофотометре Multiscan FS (ThermoFisher) (Рис.3). Жизнеспособность клеток рассчитывали, как процент значения поглощения образца по сравнению с нормализованным значением поглощения контроля без воздействия соединения.

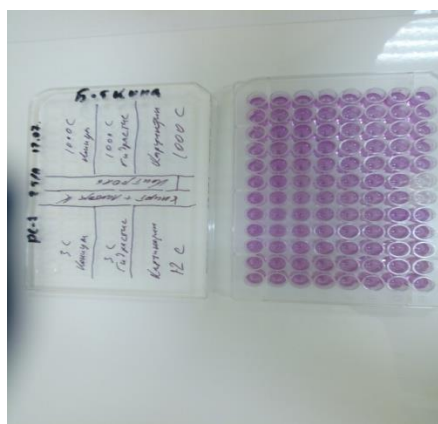


Рисунок 3 - Визуальная оценка жизнеспособности клеток после 48-часового воздействия ГЛС (МТТ-тест, клеточная культура РС-3)

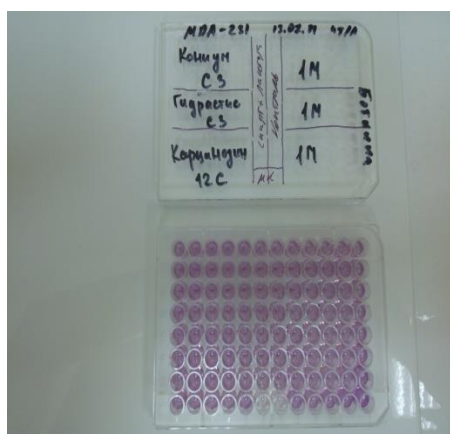


Рисунок 4 - Визуальная оценка жизнеспособности клеток после 48-часового воздействия ГЛС (МТТ-тест, клеточная культура MDA-231)



Рисунок 5 - Спектрофотометр Multiscan FS (ThermoFisher)

2.1.5 Оценка уровня апоптоза и варианта клеточной гибели методом проточной цитофлуориметрии

Для исследования влияния гомеопатических препаратов на индукцию апоптоза и оценки варианта клеточной гибели использовали опухолевую (лимфобластную) клеточную линию Jurkat. Состояние клеток определяли с помощью проточной цитофлуориметрии – современного метода, обеспечивающего быстрый и качественный мультипараметрический анализ живых (мертвых) индивидуальных клеток. Количество жизнеспособных, погибших и апоптотических клеток подсчитывали с использованием набора флуоресцентных красителей, набор Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Abcam, Великобритания), на цитометре «CytoFlex» (Beckman Coulter, США). Набор включает два красителя и позволяет выделить клетки на разных стадиях апоптоза и некроз.

Оценка уровня воздействия на клетки проводилась через 48 часов путем учета количества живых клеток, клеток в состоянии апоптоза и некротизированных клеток по уровню флуоресценции и виду красителя для чего клетки извлекались из планшета, осаждались центрифугированием (5 мин, 200g) и ресуспендировались в красящем буфере, содержащем смесь аннексин V – FITC и пропидий иодид. Далее цитофлуориметрически подсчитывали живые клетки (отрицательные по обоим красителям), погибающие клетки в состоянии раннего апоптоза (аннексин V-FITC-

положительные), позднего апоптоза (положительные по обоим красителям) и (некротические) погибшие клетки, окрашиваемые только пропидий иодидом.

2.1.6 Статистическая обработка

Обработку результатов осуществляли с помощью программы STATISTICA для Windows, версия 12.0 и пакета статистики MS Excel. Для межгруппового сравнения использовали t-тест Стьюдента. Различия между группами считались достоверными при $p < 0,05$.

3 Результаты и обсуждение

Сравнительная оценка цитотоксического действия в МТТ тесте не выявила значимых различий жизнеспособности клеток рака молочной железы в группах воздействия гомеопатическими препаратами между собой и в сравнении с контрольной группой (рис. 6).

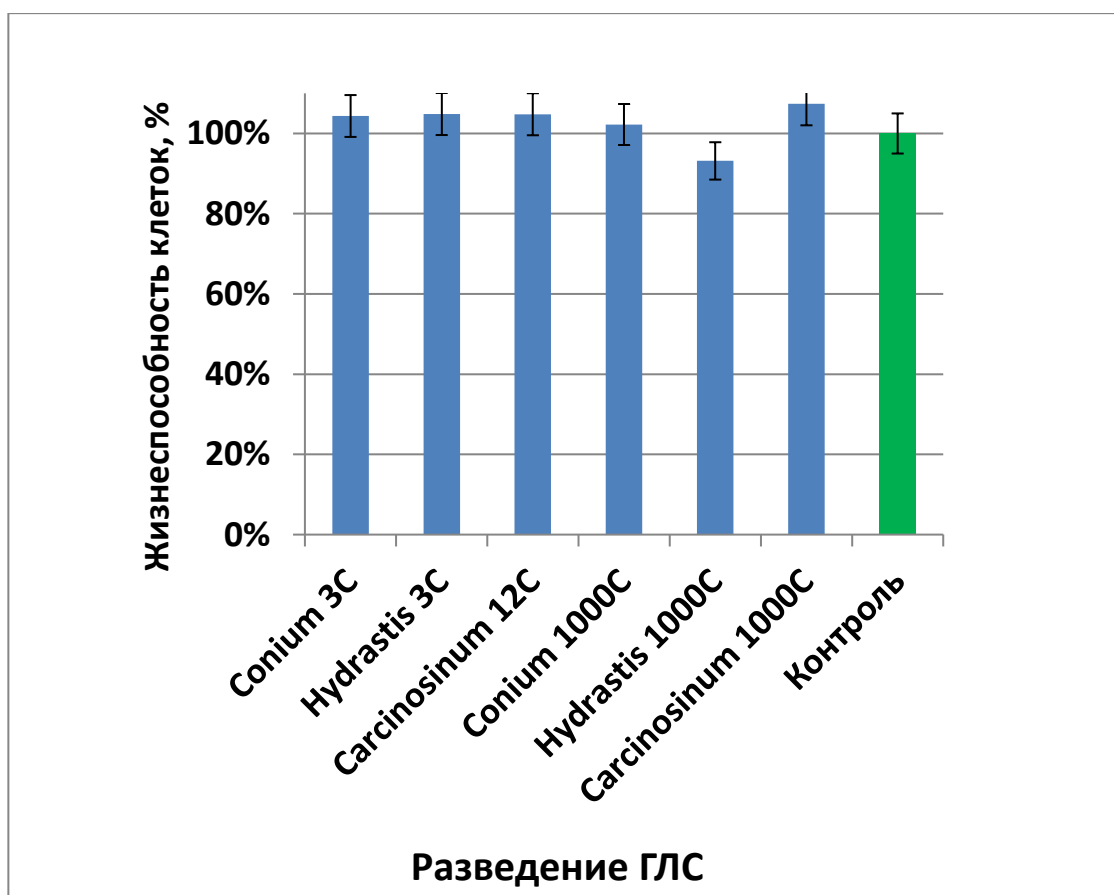


Рисунок 6 - Влияние различных разведений ГЛС на пролиферацию клеток рака молочной железы MDA-MB-231

Отмечено также отсутствие статистически значимой разницы в воздействии между максимальными и минимальными концентрациями препаратов. Рост и пролиферация клеточной культуры рака молочной железы *in vitro* проходила с обычной для данной культуры скоростью, при этом воздействие гомеопатических препаратов не привело к видимым морфологическим изменениям клеток. Воздействие препаратов на культуру рака простаты также не позволило выявить достоверных отличий от контрольной группы (рис. 7). Оптическая микроскопия клеток не выявила визуально заметных патологических изменений в морфологии клеток и структуре внутриклеточного содержимого. Рост культур клеток рака простаты и рака молочной железы соответствовал контрольным параметрам, клетки хорошо агитировали к поверхности, наблюдалось незначительное количество флотирующих клеток. Редуктазная активность клеток осталась на достаточно высоком уровне, что и отражено в результатах МТТ теста.

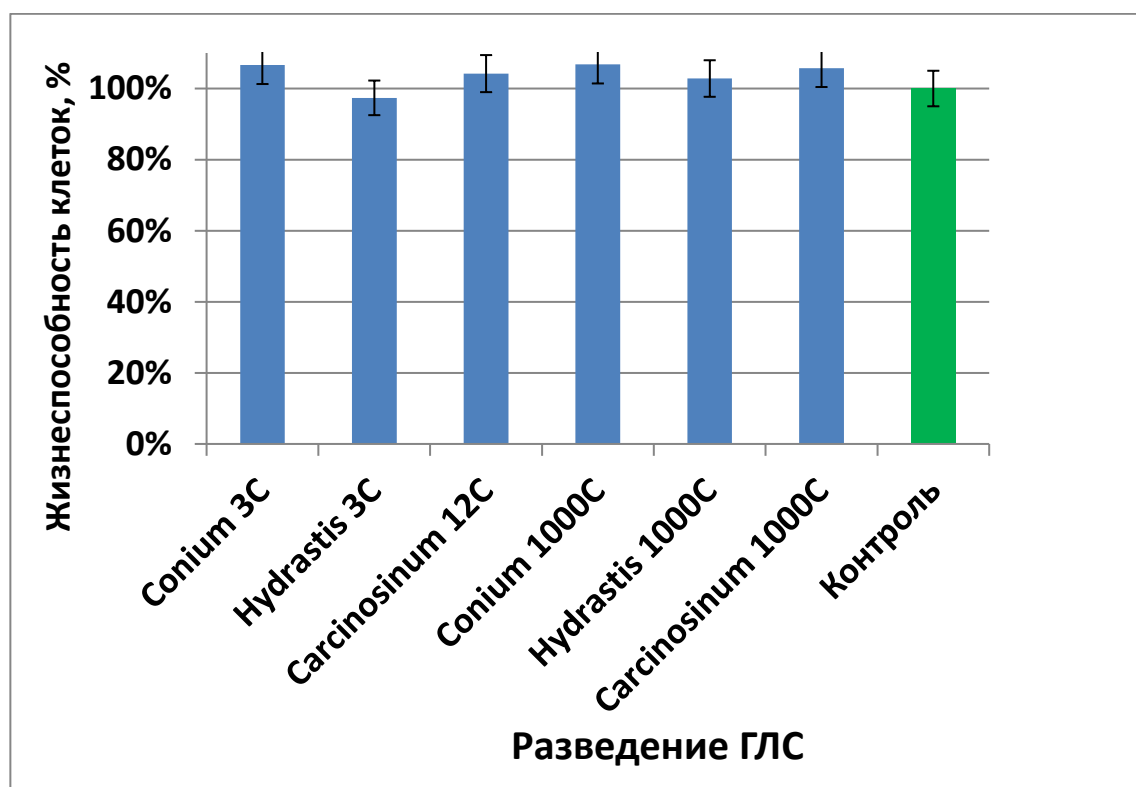


Рисунок 7 - Влияние различных разведений ГЛС на пролиферацию клеток РС-3

Стоит отметить небольшое снижение жизнеспособности при воздействии препарата Hydrastis в обоих исследованных разведениях. Несмотря на отсутствие значимых отличий от группы контроля, данный эффект препарата проявился на разных клеточных культурах, что возможно требует более детального изучения или использования большего диапазона доз в эксперименте. При анализе этих данных нужно принять во внимание, что, несмотря на многолетнюю историю применения гомеопатических препаратов в медицине, до сих пор было проведено очень мало контролируемых клинических исследований, чтобы оценить эффективность гомеопатии в лечение рака. Основные работы в данном направлении посвящены оценке эффектов *in vitro* [57]. Однако, данные по изучению противоракового действия ГЛС очень противоречивы [58]. Ряд авторов показывает, что основные эффекты гомеопатических препаратов не превышают действие плацебо [59]. В некоторых исследованиях отмечаются определенные позитивные воздействия гомеопатии в терапии рака, однако, не позволяющие сделать статистически достоверных выводов об их эффективности в целом [60]. Есть данные об активности некоторых гомеопатических препаратов, в частности *Conium*, в отношении рака простаты [61]. Однако авторы подчеркивают, что эффективность отмечена только на моделях *in vivo*, тогда как на клеточных моделях *in vitro* выраженного действия показать не удалось. В целом, для гомеопатии характерно применение сверхвысоких разведений, поэтому в данном исследовании мы постарались использовать максимальный доступный разброс потенций препаратов, начиная с 3C, характеризующейся заметным присутствием молекул действующего вещества в растворе, до 1000C, с точки зрения химии, не содержащей ни одной молекулы вещества. Очевидно, что эффекты разведений 3C-12C могут с известными допущениями объясняться действием молекул лекарства на основе стандартных фармакологических механизмов. Отметим, что взаимодействие доза-эффект лекарственных средств может характеризоваться не только линейной зависимостью, но в некоторых случаях

иметь пики или даже оказывать противоположный эффект при изменении концентрации. Действие препаратов в разведениях выше 12С может объясняться исключительно альтернативными фармакологическими гипотезами или эффектом плацебо при использовании *in vivo* [62]. В этом контексте интересным является квантовый подход к объяснению возможных механизмов действия веществ в малых разведениях [8]. Взаимодействие между препаратом и таргетной молекулой в клетке может базироваться на квантово-химическом взаимодействии в микромире биологических объектов. В рамках такого подхода все воздействия (в том числе и гипотетические информационные) передаются через электромагнитные волны и частицы, которые взаимодействуют друг с другом. При этом слабые сигналы иногда могут давать более сильный ответ, чем сильные, т.к. по мере увеличения их количества расширяется зона деструкции. Это гипотезу дополняют эксперименты нобелевского лауреата Люка Монтанье, обнаружившие способность у фильтрующихся вирусных частиц производить электромагнитные волны низкой частоты воспроизводимым образом после соответствующих разбавлений в воде. Это, по сути, является новым свойством ДНК, которая в некоторых последовательностях способна излучать электромагнитные волны. Излучение таких волн, вероятно, представляет собой явление резонанса, зависящее от возбуждения окружающим электромагнитным шумом [63]. Проведенные в данном исследовании эксперименты на клеточных культурах не подтверждают наличие прямого цитотоксического действия у изученных препаратов (Рис. 5,6). Более того, отсутствие значимых различий между крайними диапазонами концентраций одного препарата позволяет заключить, что наличие молекул действующего вещества не влияет на уровень жизнеспособности и пролиферации опухолевых клеточных культур *in vitro*. При этом параметры жизнеспособности опухолевых клеток при воздействии различных препаратов достоверно не отличаются от параметров контрольной группы. Отсутствие достоверных эффектов изучаемых препаратов на модельных опухолевых

линиях *in vitro*, позволяет исключить основные механизмы прямого повреждающего цитопатического действия у данных гомеопатических лекарств. Полученные результаты, однако, не позволяют полностью исключить потенциальное наличие таких эффектов в живых организмах. Очевидно, что воздействие микроокружения клеток, в том числе и электромагнитное, будет более значимое и комплексное в объекте *in vivo*. В нашей работе схожие результаты получены на нескольких опухолевых клеточных линиях, что в общем согласуется с предположением об отсутствии специфического компонента воздействия у ГЛС. С фармакологической точки зрения при наличии неспецифического цитотоксического эффекта у препарата, он предсказуемо должен был бы реализоваться схожим образом на всех исследованных опухолевых моделях. Важно отметить, что в работе [38] показан цитотоксический эффект препарата Hydrastis на клетки рака молочной железы нескольких клеточных линий. При этом авторы также отмечают, что в разведениях 2С-200С не определяется статистически значимых отличий от контрольной группы, а заметные эффекты наблюдаются только у матричной настойки. При этом авторы отмечают повышение уровня апоптоза в популяции. Поэтому на следующем этапе данной работы мы провели сравнительное исследование уровня индукции апоптоза и вариантов клеточной гибели при воздействии изучаемых препаратов в разведениях 3С (12С – для Carcinosinum) и 1000С. Результаты цитофлуориметрического анализа клеток опухолевой линии Jurkat после воздействия препаратов показаны на рисунках 8-10.

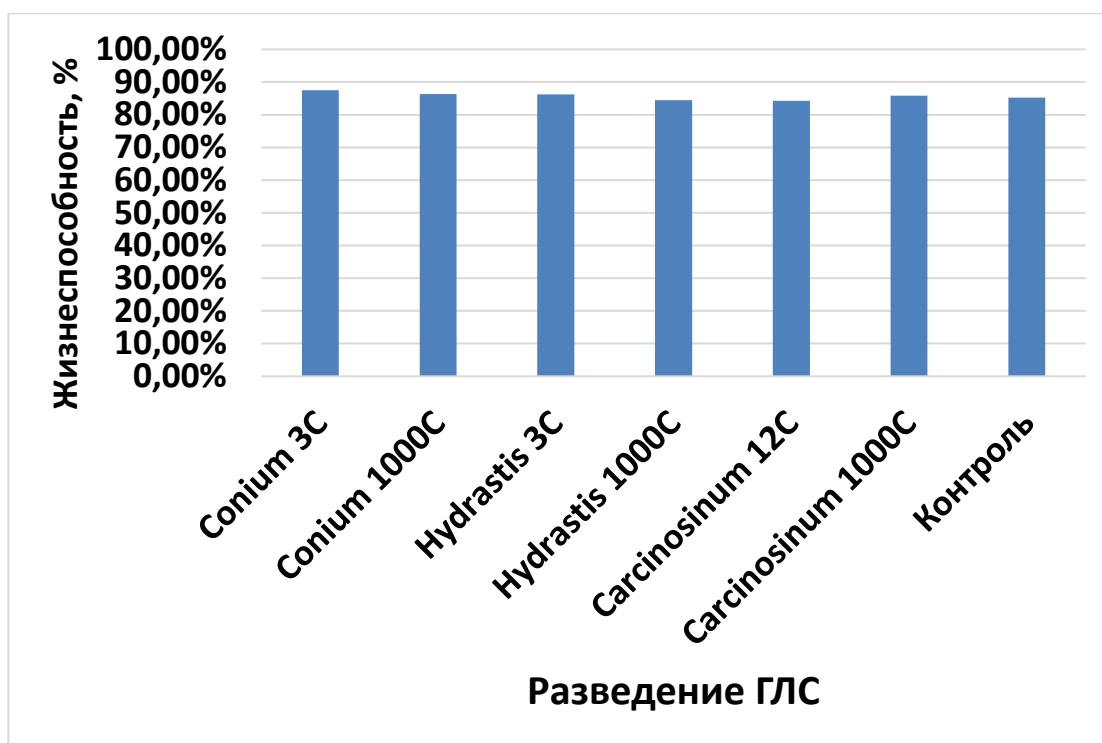


Рисунок 8 - Влияние различных разведений ГЛС на жизнеспособность клеток Jurkat

Как видно из рисунка 8, распределение жизнеспособности клеток соответствует ранее полученным данным и в целом не отличается от интактного контроля без воздействия. Можно отметить незначимую тенденцию к снижению жизнеспособности лейкозных клеток при воздействии препаратов *Hydrastis* и *Carcinosinum*.

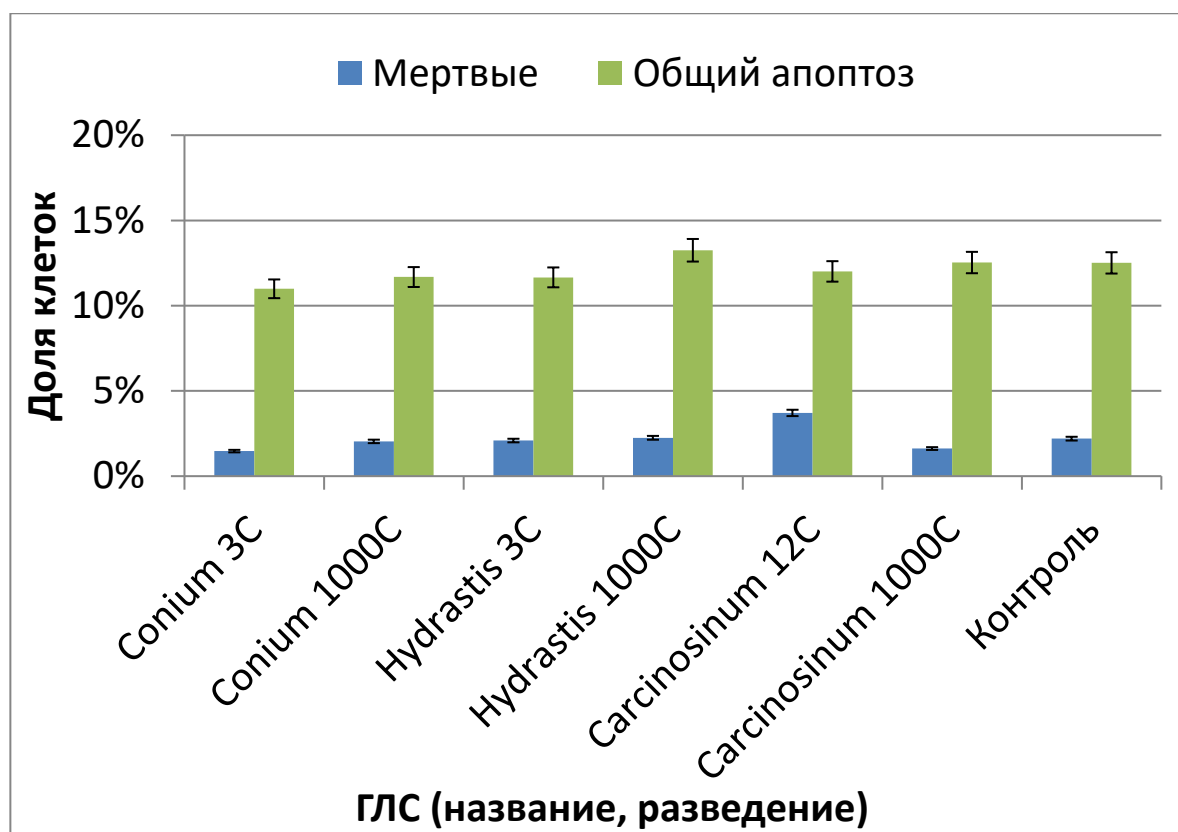


Рисунок 9 - Влияние различных разведений ГЛС на уровень некроза и апоптоза в популяции клеток Jurkat.

Показано, что распределение мертвых и апоптотических клеток имеет более широкий разброс значений у разных препаратов и разведений этих препаратов (рис. 9). Однако данная вариабельность укладывается в пределы погрешности метода и не позволяет выделить значимые отличия от контрольной группы. При этом выявлен несколько более высокий уровень общего апоптоза клеток при воздействии препаратов Hydrastis и Carcinozinum в разведении 1000С. Рассмотрение вариантов клеточной гибели при воздействии всех препаратов позволяет заключить, что идет преимущественно апоптотический вариант этого процесса. Первично-некротического действия препаратов не установлено и уровень некроза в популяции соответствует контролю.

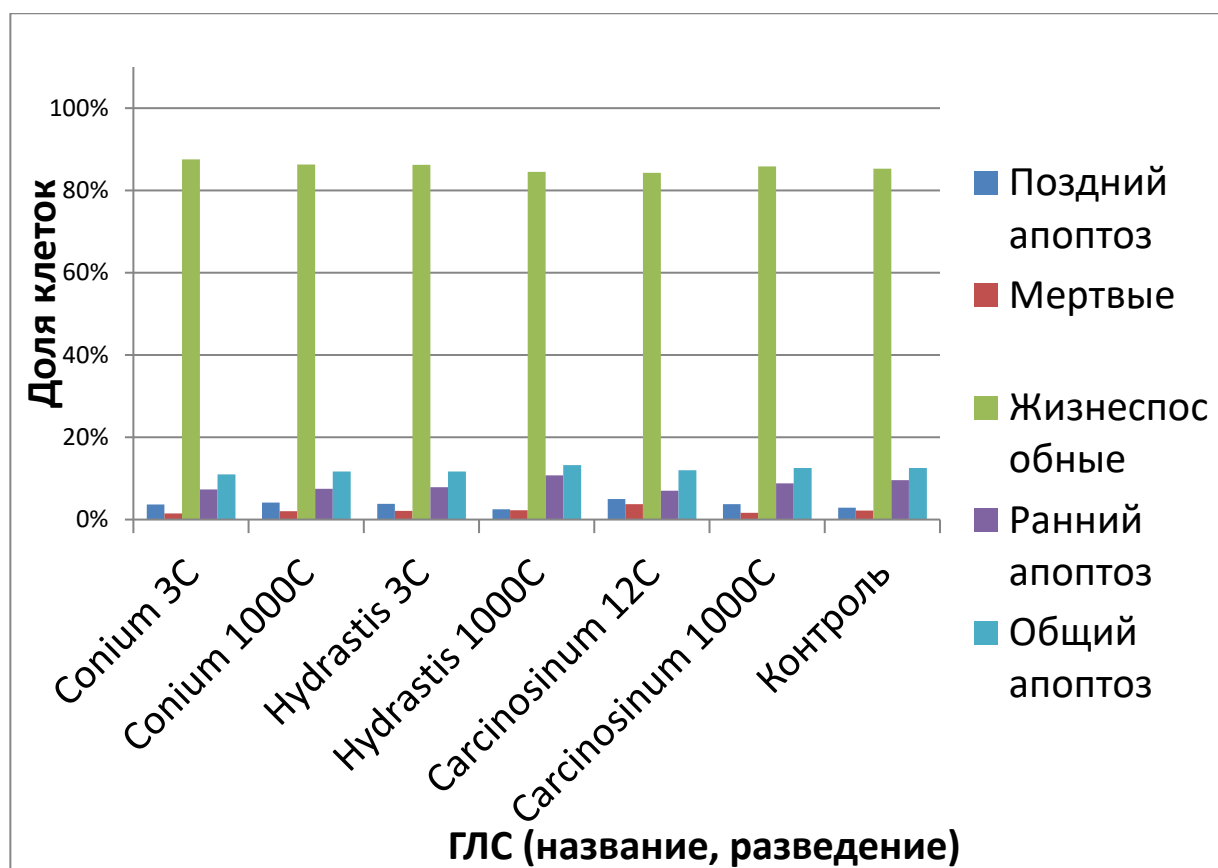


Рисунок 10 - Распределение стадий клеточной гибели при воздействии ГЛС в популяции клеток Jurkat

Распределение фракций апоптоза показано на рисунке 10. Очевидно, что основную фракцию составляют ранне-апоптотические клетки, которые с течением времени переходят на стадию позднего апоптоза и погибают. Можно отметить тенденцию к сравнительному увеличению количества ранне-апоптотических клеток выше 10% в популяции при воздействии препарата *Hydrastis*. Однако и в данном случае статистически достоверной разницы по распределению фракций апоптоза между препаратами в различных концентрациях не установлено.

Исходя из структуры препаратов сложно предположить наличие специфического рецептора для реализации их биологической активности. Поэтому, не вдаваясь в спекуляции на тему механизмов действия данных препаратов, можно лишь осторожно предположить реализацию подобных эффектов посредством определенных каскадных механизмов усиления и

конвергенции сигнала (триггером которого могут быть данные препараты). Этим может объясняться слабость и высокая вариабельность наблюдаемых эффектов.

Полученные результаты в целом подтверждают, что биологические эффекты различных веществ в сверхвысоких разведениях могут отличаться, но в большинстве случаев эти эффекты крайне слабые и легко маскируются мешающими воздействиями и погрешностью в эксперименте. При этом стоит заметить, что не каждое вещество в сверхмалой дозе и не на любой биологический объект оказывает доказанное влияние, т.е. полученные эффекты сверхмалых концентраций исследуемых веществ нельзя связать с какой-то их определенной молекулярной структурой или уровнем организации биологической модели [64].

Однако следует иметь в виду ограниченные возможности экстраполяции данных, полученных с использованием клеточных культур.

4 Анализ применения ГЛС в клинической практике

С целью оценки эффективности ГЛС в клинике, ретроспективно был проведен анализ нескольких случаев заболеваний из практики врачей-гомеопатов. Все данные в рассмотренных случаях деперсонифицированы.

Случай 1. Холангиокарцинома у 78-летней женщины. Состояние после резекции левой доли печени, рецидив в правой доле, прогрессивный рост.

На консультацию к врачу-гомеопату обратилась женщина 78 лет, монахиня. Из анамнеза: 3 года назад – холецистэктомия по поводу желчно-каменной болезни, 2 года назад при плановом обследовании на УЗИ органов брюшной полости обнаружена опухоль в левой доле печени, в связи с чем она была госпитализирована в онкоцентр, где была проведена КТ ОБП, выявлена опухоль размером 10 см в диаметре, занимающая всю левую долю печени, без признаков метастазирования, была взята пункция и установлен диагноз: холангиокарцинома печени. Пациентке была произведена резекция левой доли

печени. Но через 2 года на КТ выявлен рецидив опухоли в правой доле печени. Врач-онколог не рекомендовал проведение повторной операции, больная обратилась за гомеопатической помощью в качестве альтернативного лечения. Из обследований: кровь на онкомаркеры: СА-19-9 – 340,8 (норма -35), УЗИ ОБП: очаговое образование в правой доле печени 70*70 мм, левая доля удалена; на КТ: признаки множественных метастазов в правой доле печени; на повторном УЗИ ОБП через 3,5 месяца: прогрессивный опухолевый рост, размеры образования 82*82 мм, новый очаг 36*29 мм. Жалобы, с которыми обратилась пациентка: сильная слабость в течение последних нескольких месяцев («такая, что не могу поднять голову с подушки»), тошнота от слабости; приступы головокружений, головокружения в постели, при поворотах с боку на бок, при резком изменении положения тела; бессонница (долго не может уснуть); «наружная дрожь», когда понервничает. Пациентка получала гомеопатическое лечение: последовательно - Phosphor, Conium, Hydrastis в Q-потенциях + органотропные препараты (Cheledonium, Cholesterinum) в низких разведениях.

Комментарий к случаю: Следует отметить, что прогноз выживания при холангиокарциноме – один из самых неблагоприятных. Лечение эффективно при условии своевременного хирургического вмешательства на начальных этапах заболевания, когда выявить наличие раковых клеток практически невозможно. При обнаружении опухоли и наличии метастазов лечение носит паллиативный характер и способствует продлению жизни в среднем до нескольких недель. Гомеопатическое лечение позволило пациентке прожить 2 года, обходясь без наркотических анальгетиков.

Случай 2. Рецидивирующая карцинома мочевого пузыря.

Мужчина 32 года, женат, трое детей. Явился на прием к гомеопату с жалобами на: тянущие боли в правой паховой области, дневную потливость в области поясницы, «заеды» в углах рта, белые пятна на ногтях рук.

Два года назад - удалена карцинома мочевого пузыря, проведено несколько курсов химиотерапии, но год назад на цистоскопии выявлен

рецидив карциномы, получил 8 курсов химиотерапии, на контрольной цистоскопии опухоль не обнаружена. Пациент опасался рецидива опухоли.

Назначение: Thuja 10 M, 100 M – в течение двух лет. В настоящее время амочувствие хорошее, КТ – норма, УЗИ мочевого пузыря – норма (3 года назад были полипы. Катамнез 2,5 года.

Случай 3. Злокачественная гистиоцитома щеки.

В марте 2007г – на приеме у гомеопата девушка 25 лет, страдающая от раковой опухоли 6*6 см на внутренней поверхности левой щеки, деформирующей овал лица. В ходе опроса удалось выяснить, что это рецидив опухоли, 1 год назад у нее появилась небольшая опухоль на внутренней поверхности левой щеки, врач-стоматолог на приеме удалил ее, без последующего гистологического исследования. Через 8 месяцев на месте удаления вновь появилось образование и стало прогрессивно расти. Девушка обратилась в онкоцентр, была произведена биопсия, гистологически: злокачественная гистиоцитома, пациентке было предложено хирургическое лечение, от которого она отказалась. Пациентке назначались: Phytolacca decandra, Mercurius solubilis, опухоль стала уменьшаться в размерах и в мае 2007 она была размером 2*2 см, больной был назначен Mercurius повторно, в течение последующего месяца опухоль исчезла абсолютно, на ее месте остался едва заметный рубец на внутренней поверхности щеки. С тех пор рецидива рака не было. Перед выпиской из-под наблюдения гомеопата пациентка получила одну дозу Сепии 1М по поводу акне и нарушений менструального цикла. Катамнез 15 лет.

Комментарий: местные рецидивы данной опухоли развиваются в среднем через 16 месяцев после хирургического удаления, случаются в 26% случаев. Общий уровень метастазирования – около 32%. Гистиоцитома метастазирует через 12-14 месяцев после установления диагноза, при этом 96% метастазов возникает в первые 5 лет. 5-летняя выживаемость у женщин с данной патологией составляет 18,7% [65].

Случай 4. Саркома мягких тканей грудной стенки у мужчины 30 лет,

III стадия, рецидив. Метастазы в левое легкое. Канцероматоз плевры слева. Диагноз саркомы установлен в 2012 году, в феврале 2012г проведена операция по удалению опухоли с резекцией ребер, после чего проведено 6 курсов ПХТ и ЛТ на область рубца. Обратился с жалобами на подъем температуры до 38-39С, появление отеков нижних конечностей и покалывания в них, выпадение волос на фоне химиотерапии, носовые кровотечения, потливость грудной клетки во сне и тупые боли в спине. Назначен Phosphor Q3-Q30.

При рентгенологическом исследовании от января 2014г: уменьшение количества жидкости в левой плевральной полости, данных за прогрессирование метастатического поражения органов грудной клетки не получено. В течение 5 лет гомеопатического лечения пациент принимал Phosphor, пройдя шкалу с Q3 до Q30. Промежуточно получил несколько доз Tuberculinum, однократно – Medorrhinum. Самочувствие было стабильно хорошим, стал реже приходить на прием. В 2021 г умер от побочных эффектов химиотерапии. Срок курации – 9 лет.

Комментарий: агрессивность опухоли, III стадия онкологического процесса, продолжительная химиотерапия делают прогноз для выздоровления очень неоднозначным. Часто в таких случаях приходится рассчитывать только на ремиссию. Обычно в подобных случаях при метастазировании процесса на фоне адекватного лечения 5-летняя выживаемость составляет 30% [66].

Случай 5. Рак яичников у 70-летней пациентки, IV стадия. Метастазы в легкие и печень. Экссудативный раковый плеврит.

Первичный визит к гомеопату - в октябре 2015г с жалобами: в течение последних 3 месяцев частый кашель, выраженная одышка при ходьбе и малейшей нагрузке. Диагноз выставлен в 1992 г: Рак правого яичника, состояние после двусторонней овариэктомии и гистерэктомии от 1992 г (в 47 лет). До 2002 г пациентка чувствовала себя хорошо. В 2002 г – рецидив – конгломерат метастазов в подвздошной области. Проведено паллиативное хирургическое лечение + химиотерапия. В 2010 г – рецидив – метастазы в брюшной полости. На момент обращения – большая пальпируемая опухоль

брюшной полости 30*30 см, бугристая, каменной плотности, умеренно болезненная при пальпации.

УЗИ ОБП: объемное образование, метастазы брюшной полости, свободная жидкость в малом тазу (200мл), гепатомегалия, диффузные изменения поджелудочной железы.

Рентген ОГК: множественные очаговые тени – метастазы, свободная жидкость в плевре (1000мл).

Консультация онколога: химиотерапия и оперативное лечение не показаны.

Пациентке назначались последовательно: Carbo-animalis, Conium в Q-потенциях, Syphylinum и другие органотропные препараты, благодаря которым пациентка с терминальной стадией рака прожила без болей 2 года (умерла осенью 2017г).

Комментарий: IV стадия данного вида рака считается неизлечимой. Обычно ремиссия на этом этапе длится максимум несколько месяцев, после чего наступает стремительный рецидив.

Случай 6. Диффузная мастопатия у кормящей матери, рецидивирующие лактостазы. Хронические головные боли. В 2012 г к врачу-гомеопату обратилась женщина 30 лет, кормящая мать (ребенку 6 месяцев) с жалобами на: сильные прокалывающие боли в правой молочной железе, из-за чего с трудом кормит ребенка, 2 раза в неделю – повторяющиеся лактостазы, правая грудь всегда плотная, даже после кормления. Сопутствующие симптомы: выраженная общая слабость, появившаяся после родов, паралитическая слабость в ногах. Психика: крайне встревожена, сильный страх рака, часто плачет. Лучше от присутствия рядом того, кто мог бы ее утешить и успокоить.

В анамнезе жизни: в 12 лет – травма правой груди (удар о руль велосипеда), с 15 лет периодически боли в правой груди, правая грудь всегда имела более плотную структуру по сравнению с левой. Другие симптомы: с подросткового возраста – тяжелые мигрени 1-2 раза в неделю, по 3 дня,

сопровождающиеся рвотой, вынуждена лежать; запоры по 2 дня; хроническая петехиальная сыпь в области грудной клетки; легко образуются синяки; сильное желание соли; в детстве были носовые кровотечения; периодически снятся вещие сны. Наследственность: у бабушки туберкулез легких в молодости и рак желудка в 45 лет, умерла в 47 лет; у матери частые пневмонии, миома матки, фиброаденома молочной железы.

УЗИ молочных желез: без патологии. Проконсультирована маммологом, выставлен диагноз: Мастопатия. Проведенное лечение - без эффекта. Назначения: Conium, Phosphorus – в разных потенциях. В настоящее время пациентка получает попеременно два этих препарата. Самочувствие хорошее. Жалоб нет. Катамнез 10 лет.

Комментарий: в данном случае лечение мастопатии методом гомеопатии можно рассматривать как онкопрофилактику, т.к. мастопатия часто ассоциирована с развитием рака молочной железы у женщин [67].

Случай 7. Узловая мастопатия у кормящей матери. Рецидивирующие лактостазы. Артериальная гипертония. Женщина 38 лет, кормящая мать (ребенку 5 мес.), обратилась за помощью к гомеопату в 2013 г: рецидивирующие лактостазы, чаще слева, прокалывающие боли в обеих молочных железах.

Обследована у маммолога, диагноз: Узловая мастопатия. Рекомендации не принесли эффекта.

Объективно: при пальпации левая грудь более бугристая, пальпируются 2 узловых образования каменной плотности. Из анамнеза: в 18 лет сильный ушиб левой груди, после чего грудь стала более плотной, со временем в ней образовались 2 плотных узла: 20*20 мм и 40*40 мм. Другие симптомы: в течение последних 10 лет повышение АД до 150/100 мм. рт. ст., с головной болью, периодически принимает гипотензивные препараты; общая слабость, слабость в ногах; головокружение при ходьбе; запоры по 2-3 дня; склонность к легкому образованию синяков; потливость ладоней от волнения; жжение в ладонях; полиноз с 18 лет; за последние 5 лет ногти на ногах

приобрели желтую окраску.

Психика: раздражительная, кричит на близких, гневливая, сочувствующая, брезгливая.

Наследственность: мать – злокачественная гипертония, устойчивая к гипотензивным препаратам, с цифрами АД до 220/110 мм. рт. ст.

Пациентке назначались последовательно: Phosphorus, Conium.

На фоне лечения: объективно – при пальпации уплотнения не определяются, грудь стала мягкая; болей в груди нет, АД стабильное с редким повышением на смену погоды.

Случай 8. Узловая мастопатия. Хронический бронхит.

Диагноз выставлен на основании данных объективного, лабораторного и инструментального обследования. Женщина 45 лет, монахиня, обратилась в 2013 г по поводу болезненного уплотнения в правой молочной железе, возникшее 1 неделю назад, с жалобами: на прокалывающие боли в правой молочной железе «как от электрического разряда», жгучие боли в области уплотнения, образование плотное, болезненное при пальпации, после пальпации появляются жжение и зуд. Объективно: пальпируется плотное образование в глубине правой молочной железе размером 35*35 мм. Факт травмы груди в прошлом пациентка отрицает. Другие жалобы: постоянный кашель, периодически – цветные вспышки и зигзаги перед глазами, головокружения во время прогулки; периодически – повышение АД; холодные стопы.

Назначение: Conium 10M.

Через 1 неделю: боли в груди меньше на 70%, опухоль не пальпируется.

Через 1 месяц: опухоль не пальпируется, боли в молочной железе существенно меньше, общая слабость, головокружения – лучше на 50%.

Назначения: Conium, Phosphorus, Tuberculinum. В настоящее время пациентка чувствует себя хорошо, жалоб нет, по результатам обследований – норма. Катамнез 9 лет.

Комментарий: последние 2 случая демонстрирует комплексный эффект

от гомеопатических препаратов – параллельно с излечением мастопатии у первой пациентки нормализовалось артериальное давление, у второй – исчез хронический бронхит.

Таким образом, анализ клинических случаев подтверждает данные литературы о наличии положительного влияния ГЛС на организм человека [3,4,21,22,32]. Однако механизмы его возникновения остаются до конца не ясными и требуют дальнейшего изучения.

5 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

В данной работе представлена оценка цитотоксического воздействия гомеопатических препаратов, как возможных дополняющих средств в лечении хронических заболеваний, в том числе, онкопатологии, на культуры раковых клеток, используемых в качестве биологической модели. Преимущества данной модели *in vitro* перед методами исследований на животных заключаются в меньших затратах времени и финансов. Помимо того, она позволяет обходить этические проблемы, касающиеся причинения вреда здоровью и гибели экспериментальных животных.

5.1 Предпроектный анализ

5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Данная работа нацелена на проведение исследований методом *in vitro* с использованием клеточных культур в качестве биологических моделей для оценки цитотоксичности гомеопатических препаратов, кандидатных на роль комплементарных лекарственных средств в лечении различных заболеваний.

Для анализа потребителей результатов исследования необходимо рассмотреть целевой рынок и провести его сегментирование. Сегментирование – это разделение покупателей на однородные группы, для каждой из которых может потребоваться определенный товар (услуга).

Потенциальными потребителями НИР в основном являются юридические лица. Карта сегментирования рынка по области применения и доли рынка сбыта продукции приведена на таблице 1.

Таблица 1 – Карта сегментирования рынка по области применения *in vitro* исследований

Область реализации исследований	Доля, %
Фармацевтическая отрасль	35
Парфюмерно-косметическая отрасль	35
Пищевая отрасль	20

Из приведенной карты сегментирования можно сделать вывод, что основными областями применения *in vitro* исследований являются фармацевтическая и парфюмерно-косметическая отрасли, в них же наблюдается наибольшее число альтернативных методов. Потенциальными потребителями выбраны фармацевтическая и парфюмерно-косметическая отрасли.

5.1.2 Анализ конкурентных технических решений

В ЕАЭС (евразийском экономическом союзе), как и в РФ, предъявляются общепринятые требования безопасности к веществам, контактирующим с человеком. Одним из таких требований является индекс токсичности (общетоксическое действие).

Существуют разные способы проведения токсикологических испытаний: *in vivo* и *ex vivo* или *in vitro*.

Исследования *in vivo* проводятся на живых организмах. Сюда относят тестирования на животных и клинические испытания на людях. К недостаткам данных методов можно отнести высокую стоимость исследований, необходимость соблюдения условий (специальные боксы для животных, диета, забор крови и других биологических жидкостей на анализ и др.), проведение антибиотикотерапии для предотвращения развития нежелательных бактериальных инфекций, затруднение процесса размножения, необходимость утилизации погибших в результате эксперимента животных, а также - негативное отношение общества к подобного рода исследованиям. К преимуществам метода можно отнести достаточно высокую достоверность полученных результатов и, соответственно, возможность экстраполяции на популяцию, а также - применения в качестве моделей заболеваний на животных. Более того, использование трансгенных животных позволяет понять механизмы действия фармакологических препаратов, определить возможный для их эффективного воздействия диапазон доз, выявить нежелательные побочные явления препаратов и т.д.

В исследованиях *ex vivo* используют изолированные органы и ткани живых организмов. Результаты таких экспериментов, также как и экспериментов *in vitro*, не могут послужить основанием для начала клинических испытаний каких-либо веществ. Плюсами исследований *ex vivo* являются широкая известность и большая релевантность полученных данных клинике.

В таблице 2 приведена оценочная карта сравнения конкурентных методов исследований. В таблице B_{ϕ} обозначено разрабатываемое решение, B_{k1} , B_{k2} – конкурентные методы исследований (аналоги): *in vivo* и *ex vivo*, соответственно.

Таблица 2 – Оценочная карта для сравнения конкурентных методов исследований

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		B_{ϕ}	B_{k1}	B_{k2}	K_{ϕ}	K_{k1}	K_{k2}
1	2	3	4	5	6	7	8
Технические критерии оценки ресурсоэффективности							
1. Надежность (достоверность) результатов	0,2	2	5	3	0,4	1	0,6
2. Трудоемкость исследований	0,2	5	1	3	1	0,2	0,6
3. Продолжительность исследований	0,2	5	1	4	1	0,2	0,8
4. Безопасность исследований	0,1	5	3	5	1	0,3	1
Экономические критерии оценки эффективности							
5. Затраты	0,3	5	1	4	1,5	0,3	1,2
Итого	1				4,9	2	4,2

Критерии для сравнения и оценки ресурсоэффективности и ресурсосбережения, приведенные в таблице 2, подбираются, исходя из выбранных объектов сравнения с учетом их технических и экономических особенностей проведения исследований.

Позиция исследований *in vitro* и конкурентов оценивается по каждому показателю экспертным путем по пятибалльной шкале, где 1 – наиболее слабая позиция, а 5 – наиболее сильная. Веса показателей, определяемые экспертным путем, в сумме должны составлять 1.

Анализ конкурентных технических решений определяется по формуле:

$$K = \sum V_i \cdot B_i, \quad (1)$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента;

V_i – вес показателя (в долях единицы);

B_i – балл i -го показателя.

Выводы:

1) по техническим критериям конкурент 1 уступает рассматриваемому методу, а конкурент 2 уступает незначительно;

2) по экономическим критериям конкурент 1 и конкурент 2 уступают рассматриваемому методу.

Исходя из расчётов, сделанных выше, можно сделать вывод, что исследования *in vitro* более конкурентоспособны.

5.1.3 SWOT-анализ

Данный анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта. SWOT – (Strengths – сильные стороны, Weaknesses – слабые стороны, Opportunities – возможности и Threats – угрозы) – комплексный анализ научно-исследовательского проекта.

Результаты первого этапа SWOT-анализа представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Первый этап SWOT-анализа

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1. Низкая трудоемкость С2. Малые временные затраты С3. Малые денежные затраты С4. Безопасность для исследователя и окружающей среды С5. Этичность	Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Сложность экстраполяции данных на целый организм Сл2. Процесс ненагляден
Возможности: В1. Сохранение жизни многим лабораторным животным на первых этапах исследований В2. Биологическая доступность различных объектов исследования		
Угрозы: У1. Несвоевременное финансовое обеспечение		

научного исследования со стороны государства У2. Контаминация питательной среды, культур клеток		
--	--	--

Второй этап SWOT-анализа состоит в установлении соответствия сильных и слабых сторон научно-исследовательского проекта внешним условиям окружающей среды, что должно помочь выявить степень необходимости проведения стратегических изменений.

На данном этапе необходимо построить интерактивную матрицу проекта. Ее использование помогает разобраться с различными комбинациями взаимосвязей областей матрицы SWOT. Каждый фактор помечается либо знаком «+» (означает сильное соответствие сильных сторон возможностям), либо знаком «-» (что означает слабое соответствие); «0» – если есть сомнения в том, что поставить «+» или «-».

Интерактивные матрицы проекта представлены в таблице 4

Таблица 4 – Интерактивная матрица проекта

		Сильные стороны проекта					Слабые стороны проекта	
		C1	C2	C3	C4	C5	Сл1	Сл2
Возможности проекта	B1	0	-	-	+	+	+	+
	B2	+	-	+	+	0	-	+
Угрозы проекта	У1	-	+	+	-	-	+	0
	У2	+	+	+	+	-	-	+

Таким образом, в рамках третьего этапа может быть составлена итоговая матрица SWOT-анализа, представленная в таблице 5.

Таблица 5 – Итоговая матрица SWOT-анализа

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта:	Слабые стороны научно-исследовательского проекта:
	C1. Низкая трудоемкость	Сл1.Сложность экстраполяции данных на целый организм
	C2. Малые временные затраты	Сл.2 Процесс ненагляден
	C3. Малые денежные затраты	
	C4.Безопасность для исследователя и окружающей среды	
	C5. Этичность	
Возможности:		
V1. Сохранение жизни многим лабораторным животным на первых этапах исследований	C5. Исследования <i>in vitro</i> позволяют получить данные о биоактивности без массового убийства животных	Сл1. Переход к исследованиям <i>in vivo</i> только с самым лучшим кандидатом
V2. Биологическая доступность различных объектов исследования	C3. Приобретенные биообъекты способны размножаться и храниться в течение длительного периода	Сл2. Возможность создания 3D культур
Угрозы:		
У1. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства	C2. Отсутствие финансирования увеличит продолжительность исследований	Сл1. Отсутствие возможности закупить достаточное разнообразие биообъектов
У2. Контаминация питательной среды, культур клеток	C1. Повтор эксперимента и/или наращивание биомассы культуры заново	Сл2. Искажение результатов эксперимента

5.2 Планирование научно исследовательских работ

5.2.1 Структура работ в рамках научного исследования

Для выполнения научного исследования формируется рабочая группа, в состав которой входят: магистр, научный руководитель, консультант по разделу социальной ответственности (СО), консультант по экономическому разделу (ЭЧ) и консультант по иностранному языку (ИЯ) выпускной квалификационной работы. Составим перечень этапов и работ в рамках проведения научного исследования и проведем распределение исполнителей по видам работ (таблица 6).

Таблица 6 – Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

Основные этапы	№ раб	Содержание работ	Должность исполнителя
1		3	4
Разработка технического задания	1	Составление и утверждение технического задания	Научный руководитель, консультант ЭЧ, СО, ИЯ, магистр
Выбор направления исследований	2	Выбор направления исследований	Научный руководитель, магистр
	3	Подбор и изучение материалов по теме	Научный руководитель, магистр
	4	Патентный обзор литературы	Магистр
	5	Календарное планирование работ по теме	Научный руководитель, магистр
Теоретические исследования	6	Проведение теоретических расчетов и обоснований	Магистр
Обобщение и оценка результатов	7	Оценка эффективности полученных результатов	Научный руководитель, магистр
	8	Определение целесообразности проведения ВКР	Научный руководитель, магистр
Проведение ВКР			
Разработка технической документации и проектирование	9	Оценка цитотоксичности стабильных активных радикалов с использованием культур клеток в качестве биологических моделей	Магистр, научный руководитель
	10	Оценка эффективности производства и применения разработки	Магистр, консультант по ЭЧ
	11	Разработка социальной ответственности по теме	Магистр, консультант СО
	12	Разработка английской части ВКР	Магистр, консультант ИЯ
Оформление комплекта документации по ВКР	13	Составление пояснительной записки	Магистр

5.2.2 Определение трудоемкости выполнения работ

Трудоемкость выполнения научного исследования оценивается экспертным путем в человеко-днях и носит вероятностный характер, т.к. зависит от множества трудно учитываемых факторов. Для определения ожидаемого (среднего) значения трудоемкости $t_{ож\ i}$ используется формула (2):

$$t_{ож\ i} = \frac{3t_{\min\ i} + 2t_{\max\ i}}{5}, \quad (2)$$

где $t_{ож\ i}$ – ожидаемая трудоемкость выполнения i -ой работы, чел. – дн.;

$t_{\min\ i}$ – минимально возможная трудоемкость выполнения заданной i -ой работы, чел. – дн.;

$t_{\max\ i}$ – максимально возможная трудоемкость выполнения заданной i -ой работы (пессимистическая оценка: в предположении наиболее неблагоприятного стечения обстоятельств), чел. – дн.

Исходя из ожидаемой трудоемкости работ, определяется продолжительность каждой работы в рабочих днях T_p , учитывающая параллельность выполнения работ несколькими исполнителями:

$$T_{pi} = \frac{t_{ож\ i}}{Ч_i}, \quad (3)$$

где T_{pi} – продолжительность одной работы, раб.дн.;

$t_{ож\ i}$ – ожидаемая трудоемкость выполнения одной работы, чел. – дн.;

$Ч_i$ – численность исполнителей, выполняющих одновременно одну и ту же работу на данном этапе, чел.

5.2.3 Разработка графика проведения научного исследования

При выполнении дипломных работ студенты становятся участниками сравнительно небольших по объему научных тем, поэтому наиболее удобным и наглядным является построение ленточного графика проведения научных работ в форме диаграммы Ганта.

Диаграмма Ганта – это горизонтальный ленточный график, на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками,

характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ. Данный график строится на основе таблицы 11.

Для удобства построения графика, длительность каждого из этапов работ из рабочих дней следует перевести в календарные дни. Для этого необходимо воспользоваться формулой 4:

$$T_{ki} = T_{pi} \cdot k_{\text{кал}}, \quad (4)$$

где T_{ki} – продолжительность выполнения i – й работы в календарных днях;

T_{pi} – продолжительность выполнения i – й работы в рабочих днях;

$k_{\text{кал}}$ – коэффициент календарности.

Коэффициент календарности определяется по формуле 5:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}}, \quad (5)$$

где $T_{\text{кал}}$ – количество календарных дней в году;

$T_{\text{вых}}$ – количество выходных дней в году;

$T_{\text{пр}}$ – количество праздничных дней в году.

Таким образом:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}} = \frac{142}{142 - 18 - 4} = 1,18.$$

Результаты расчетов занесены в таблицу 7.

Таблица 7 – Временные показатели проведения научного исследования

№	Название работ	Трудоемкость работ			Исполнители	Т _р , раб. дн.	Т _к , кал. дн.
		t _{min} , чел- дн.	t _{max} , чел-дн.	t _{ож} , чел-дн.			
1	Составление технического задания	0,3	1	0,6	Р	0,15	0,2
		0,3	1	0,6	М	0,15	0,2
		0,3	1	0,6	К ¹	0,15	0,2
		0,3	1	0,6	К ²	0,15	0,2
2	Выбор направления исследований	0,5	2	1	Р	0,5	0,6
		0,5	2	1	М	0,5	0,6
3	Подбор и изучение материалов	6	12	8,4	Р	4,2	5
		6	12	8,4	М	4,2	5
4	Литературный обзор	7	10	8,2	М	8,2	9,7

Продолжение таблицы 7

5	Календарное планирование работ по теме	1	2	1,4	P	0,7	0,8
		1	2	1,4	M	0,7	0,8
6	Проведение теоретических расчетов и обоснований	2	3	2,4	M	2,4	2,8
7	Оценка эффективности результатов	2	3	2,4	P	1,2	1,4
		5	7	5,8	M	2,9	3,4
8	Определение целесообразности проведения ВКР	6	7	6,4	P	3,2	3,8
		6	7	6,4	M	3,2	3,8
9	Оценка цитотоксичности стабильных активных радикалов с использованием культур клеток в качестве биологических моделей	5	10	7	M	7	8,3
10	Оценка эффективности производства	7	10	7,6	M	4,1	4,8
		7	10	7,6	K ¹	4,1	4,8
11	Разработка СО	7	10	8,2	M	4,1	4,8
		7	10	8,2	K ²	4,1	4,8
12	Разработка ИЯ	7	10	8,2	M	4,1	4,8
		7	10	8,2	K ³	4,1	4,8
13	Составление пояснительной записки	10	15	12	M	12	14,2

P – руководитель;

M – магистр;

K¹ – консультант по экономической части;

K² – консультант по социальной ответственности;

K³ – консультант по иностранному языку.

На основании таблицы был построен календарный план-график, приведенный в таблице 8.

Таблица 8 – Календарный план-график проведения НИОКР

Вид работы	Исполнители	T_{ki} , дней	Продолжительность выполнения работ													
			февраль		март			апрель			май					
			2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Составление технического задания	Руководитель, Магистр, консультант ЭЧ, СО, ИЯ	0,2														
Выбор направления исследований	Руководитель, Магистр	0,6														
Подбор и изучение материалов	Руководитель, Магистр	5														
Патентный обзор литературы	Магистр	9,7														
Календарное планирование работ	Руководитель, Магистр	0,8														
Проведение теоретических расчетов и обоснований	Магистр	2,8														
Оценка эффективности полученных результатов	Руководитель, Магистр	1,4 3,4														
Определение целесообразности проведения ВКР	Руководитель, Магистр	3,8														
Оценка цитотоксичности	Магистр	8,3														
Оценка эффективности производства и применения разработки	Магистр, консультант ЭЧ	4,8														
Разработка социальной ответственности	Магистр, консультант СО	4,8														
Разработка главы на иностранном языке	Магистр, консультант ИЯ	4,8														

Составление пояснительной записки	Магистр	14											
-----------------------------------	---------	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--



- Руководитель,



- Магистр,



- консультант ЭЧ,



- консультант СО,



- консультант ИЯ

5.2.4 Бюджет научно-технического исследования

В процессе формирования бюджета НТИ используется следующая группировка затрат по статьям:

- материальные затраты НТИ;
- затраты на оборудование;
- основная заработная плата исполнителей темы;
- дополнительная заработная плата исполнителей темы;
- отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления);
- накладные расходы.

Материальные затраты НТИ включают стоимость всех материалов, используемых при разработке проекта, в частности, сырье и материалы, покупные комплектующие изделия и полуфабрикаты, используемые в качестве объектов исследований (испытаний) и для эксплуатации, технического обслуживания и ремонта изделий – объектов испытаний (исследований). Материальные затраты и затраты на оборудование для данного НТИ представлены в таблицах 9-10.

В данную статью включены все затраты, связанные с приобретением оборудования (приборов, контрольно-измерительной аппаратуры, устройств и механизмов), необходимого для проведения работ по данной теме. Определение стоимости спецоборудования производили по действующим прейскурантам с учетом НДС. При приобретении спецоборудования учтены затраты по его доставке и монтажу в размере 15 % от его цены. Все расчеты по приобретению спецоборудования и оборудования, используемого для каждого исполнения темы, сводятся в таблице 13.

Таблица 9 – Материальные затраты

	Ед. измер	Количество	Цена за ед. руб.	Сумма, руб.
Клеточная линия Jurkat	шт. (криопробирка)	1	124500,00	124500,00
Клеточная линия РС-3	шт. (криопробирка)	1	70560,00	70560,00
Клеточная линия MDA MB 231	шт. (криопробирка)	1	70560,00	70560,00
Диметил-сульфоксид (ДМСО)	л	0,2	2475,00	495,00
Метиленовый синий	кг	0,001	8850,00	88,50
МТТ	г	5	1540,00	7700,00
Питательная среда DMEM	л	3	3000,00	9000,00
Раствор PBS	л	0,2	3640,00	728,00
Раствор трипсин-ЭДТА 0,25%	л	0,1	2800,00	280,00
Резазурина натриевая соль	шт. (комплект)	1	31000	31000
Этиловый спирт	л	5	155,00	775,00
96-луночный планшет	шт.	50	200,00	10000,00
Флаконы стерильные	уп.	1	650,00	650,00
Наконечники	уп.	10	550,00	5500,00
Пробирки	уп.	2	700,00	1400,00

Сумма		303016,50
-------	--	-----------

Таблица 10 – Затраты на оборудование для научно-экспериментальных работ

№, п/п	Наименование оборудования	Количество единиц оборудования, шт	Цена единицы оборудования, руб.
1	Вортекс	1	15500,00
2	Источник питания	1	23000,00
3	Ламинарный бокс	1	836000,00
4	Микроскоп	1	550000,00
5	СО-2 инкубатор	1	700000,00
6	Термошейкер	1	110000,00
7	Фотометр	1	700000,00
8	Центрифуга	1	200000,00
Итого			3134500,00

Для оборудования нужно рассчитать величину годовой амортизации по следующей формуле:

$$A = \frac{C_n \cdot H_a \cdot n}{100 \cdot k}, \quad (6)$$

где C_n – первоначальная стоимость оборудования;

H_a – норма амортизации, %;

n – количество дней использования оборудования;

k – количество рабочих дней в году (2021 год - 247 раб. дней).

Результаты расчетов приведены в таблице 11.

Таблица 11 – Расчет затрат по статье «Амортизация оборудования»

Наименование оборудования	C_n , руб	H_a , %	n , дн	A , руб
Вортекс	23000,00	10	10	62,75
Источник питания	836000,00		7	65,18
Ламинарный бокс	550000,00		50	16923,08
Микроскоп	700000,00		20	4453,44
СО-2 инкубатор	110000,00		60	17004,05
Термошейкер	700000,00		15	668,02
Фотометр	200000,00		20	5668,02
Центрифуга	15500,00		20	1619,43
Итого				46463,97

Статья заработной платы исполнителей темы включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением НИИ и дополнительную заработную плату:

$$Z_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп}, \quad (7)$$

где $Z_{осн}$ – основная заработная плата;

$Z_{доп}$ – дополнительная заработная плата (12-20 % от $Z_{осн}$).

Основная заработная плата ($Z_{осн}$) руководителя от предприятия рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{осн} = Z_{дн} \cdot T_p, \quad (8)$$

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d}, \quad (9)$$

где Z_m – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

при отпуске в 24 раб.дня $M=11,2$ месяца, 5-дневная неделя;

при отпуске в 48 раб.дней $M=10,4$ месяца, 6-дневная неделя;

F_d – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн. (Табл. 12).

Таблица 12 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Магистр
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней		
- выходные дни	118	118
- праздничные дни		
Потери рабочего времени		
- отпуск	24	-
- невыходы по болезни	-	-
Действительный годовой фонд рабочего времени	223	247

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_{тс} \cdot (1 + k_{пр} + k_d) \cdot k_p \quad (10)$$

где $Z_{тс}$ – заработная плата по тарифной ставке, руб.;

$k_{пр}$ – премиальный коэффициент, равный 0,3 (т.е. 30% от $Z_{тс}$);

k_d – коэффициент доплат и надбавок составляет примерно 0,2 – 0,5

k_p – районный коэффициент, равный 1,3 для Томска.

Расчет основной заработной платы приведен в таблице 13.

Таблица 13 – Расчет основной заработной платы

Исполнители	$Z_{тс}$, руб	$k_{пр}$	k_d	k_p	Z_m , руб	$Z_{дн}$, руб	T_p , раб.дн.	$Z_{осн}$, руб
Научный руководитель	35120,00	0,3	0,3	1,3	73049,60	3406,80	9,95	33897,64
Магистр	12300,00	0	0	1,3	15990,00	673,26	49,45	33292,86
Консультант по ЭЧ	35120,00	0,3	0,3	1,3	73049,60	3406,80	4,25	14478,89
Консультант СО	35120,00	0,3	0,3	1,3	73049,60	3406,80	4,25	14478,89
Консультант ИЯ	35120,00	0,3	0,3	1,3	73049,60	3406,80	4,25	14478,89

Общая заработная плата исполнителей работы представлена в таблице 14.

Таблица 14 – Общая заработная плата исполнителей

Исполнитель	$Z_{осн}$, руб.	$Z_{доп}$ (12 %), руб.	$Z_{зп}$, руб.
Руководитель	33897,64	4067,716	37965,35
Магистр	33292,86	3995,144	37288,01
Консультант ЭЧ	14478,89	1737,467	16216,36
Консультант СО	14478,89	1737,467	16216,36
Консультант ИЯ	14478,89	1737,467	16216,36
Итого	110627,17	13275,26	123902,43

В статье расходов – отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления) отражаются обязательные отчисления по установленным законодательством Российской Федерации нормам органам государственного социального страхования (ФСС), пенсионного фонда (ПФ) и медицинского страхования (ФФОМС) от затрат на оплату труда работников.

Величина этих отчислений определяется по следующей формуле:

$$Z_{внеб} = k_{внеб} \cdot (Z_{осн} + Z_{доп}), \quad (11)$$

где $k_{внеб}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный фонд, фонд обязательного медицинского страхования и пр.).

Тарифы страховых взносов в 2022 году остались на прежнем уровне в соответствии с постановлением Правительства РФ от 26.11.2015 № 1265, т. е.

есть общий совокупный тариф все также составляет 30%, в том числе: 22 процента в ПФ РФ; 2,9 процента в ФСС России; 5,1 процента – в ФФОМС.

Отчисления во внебюджетные фонды представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнитель	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.
Руководитель проекта	33897,64	4067,72
Магистр	53268,58	6392,23
Консультант ЭЧ	14478,89	1737,47
Консультант СО	14478,89	1737,47
Консультант ИЯ	14478,89	1737,47
Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды	0,3	
Итого	37170,73	

Накладные расходы учитывают прочие затраты организации, не попавшие в предыдущие статьи расходов: печать и копирование графических материалов, электроэнергия, оплата услуг связи, транспортные расходы и т.д. Их величина определяется по следующей формуле:

$$Z_{\text{накл}} = (\text{сумма статей } 1 \div 5) \cdot k_{\text{нр}}, \quad (12)$$

где $k_{\text{нр}}$ – коэффициент, учитывающий накладные расходы.

Величину коэффициента накладных расходов $k_{\text{нр}}$ допускается взять в размере 16%. Рассчитанная величина затрат научно-исследовательской работы является основой для формирования бюджета затрат проекта, который при формировании договора с заказчиком защищается научной организацией в качестве нижнего предела затрат на разработку научно-технической

Определение бюджета затрат на научно-исследовательский проект приведен в таблице 16.

Таблица 16 – Бюджет затрат на научно-исследовательский проект

Наименование статьи	Сумма, руб.	Примечание
1. Материальные затраты НИИ	303016,50	Табл. 9
2. Затраты на специальное оборудование для научных работ (амортизация)	46463,97	Табл. 11

Продолжение таблицы 16

Наименование статьи	Сумма, руб.	Примечание
3. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	110627,17	Табл. 14
4. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	13275,26	Табл. 14
5. Отчисления во внебюджетные фонды	37170,73	Табл. 15
6. Затраты на научные и производственные командировки	-	-
7. Накладные расходы	81696,59	16 % от суммы ст.1-6
Итого: бюджет затрат НТИ	592250,22	Сумма ст. 1-7

Для наглядности данные из таблицы 16 представлены в виде круговой диаграммы:

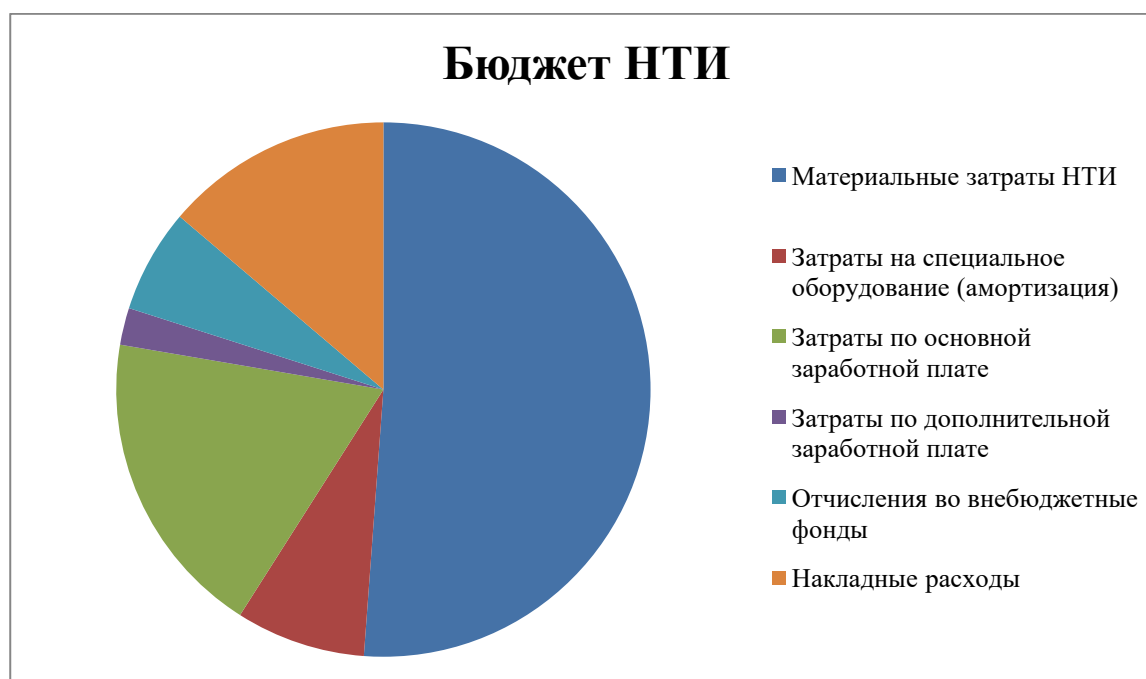


Рисунок 11 – Бюджет затрат на научно-исследовательский проект

Как видно из рисунка 1, основные затраты НТИ приходятся на материальные затраты для проведения НТИ.

5.3 Определение ресурсной, финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования. Его

нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{финр}^{исп.i} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}}, \quad (13)$$

где $I_{финр}^{исп.i}$ – интегральный финансовый показатель разработки;

Φ_{pi} – стоимость i -го варианта исполнения;

Φ_{max} – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта.

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в размах (значение больше единицы), либо соответствующее численное удешевление стоимости разработки в размах (значение меньше единицы, но больше нуля).

Стоимость альтернативных вариантов исполнения не известна, поэтому примем стоимость нашего проекта за 1, тогда интегральный финансовый показатель альтернативных вариантов будет показывать, во сколько раз они дороже или выгоднее нашего варианта.

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом по формуле (14) (таблица 17):

$$I_{pi} = \sum a_i \cdot b_i, \quad (14)$$

где I_{pi} – интегральный показатель ресурсоэффективности для i -го варианта разработки или аналога;

a_i – весовой коэффициент i -го параметра;

b_i – бальная оценка i -го варианта разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

n – число параметров сравнения.

Таблица 17 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Критерии	Весовой коэффициент параметра	Объект исследования		
		Исп.1	Исп.2	Исп.3
1. Надежность (достоверность) результатов	0,30	2	5	3
2. Трудоемкость исследований	0,30	5	1	3
3. Продолжительность исследований	0,25	5	1	4
4. Безопасность исследований	0,15	5	3	5
Итого	1	4,1	2,5	3,6

Исполнение 1 соответствует данному проекту – исследованиям *in vitro*, исполнение 2 – исследованиям *in vivo*, исполнение 3 – исследованиям *ex vivo*.

Интегральный показатель эффективности вариантов исполнения разработки ($I_{исп.i}$) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{исп.1} = \frac{I_{р-исп1}}{I_{финр}^{исп.1}}, \quad (15)$$

Сравнительная эффективность проекта ($\mathcal{E}_{ср}$):

$$\mathcal{E}_{ср} = \frac{I_{исп.1}}{I_{исп.2}}, \quad (16)$$

Таблица 18 – Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Исп.1	Исп.2	Исп.3
1	Интегральный финансовый показатель разработки	1,0	3,0	1,2
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	4,1	2,5	3,6

Продолжение таблицы 18

№ п/п	Показатели	Исп.1	Исп.2	Исп.3
3	Интегральный показатель эффективности	4,1	0,8	3,0
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	1	5,1	1,4

Из полученной таблицы можно сделать вывод, что текущий проект имеет большую эффективность по сравнению с аналогами, но не лишен недостатков.

6 Социальная ответственность

Социальная ответственность - ответственность отдельного ученого и научного сообщества перед обществом. Первостепенное значение при этом имеет безопасность применения технологий, которые создаются на основе достижений науки, предотвращение или минимизация возможных негативных последствий их применения, обеспечение безопасного как для испытуемых, как и для окружающей среды проведения исследований.

Тема данной научно-исследовательской работы: «Критическая оценка эффективности ряда гомеопатических средств: плацебо эффект в биологии и клинике».

Объект исследования – гомеопатические препараты в различных разведениях и клеточные культуры *Jurkat*, *PC-3* и *MDA MB 231*.

Цель исследования: оценка биологического действия нескольких гомеопатических препаратов на опухолевые клетки человека.

Исследуемые гомеопатические препараты представляют собой потенцированные сильно разведенные растворы различных веществ, нанесенные на сахарную крупку. Какого-либо вредного воздействия на биологические организмы и окружающую среду данные средства оказывать не могут в силу их высокого разведения ($1:10^6$ и выше). В то же время, согласно литературным данным, гомеопатические препараты могут влиять на

жизнеспособность раковых клеток, а также используются в лечении различных заболеваний.

Экспериментальная часть проводилась в лаборатории клеточных исследований Томского политехнического университета (г. Томск, Томская область, Россия), которая является коллективным рабочим местом. Раздел также включает в себя оценку условий труда на рабочем месте, анализ вредных и опасных факторов труда, разработку мер защиты от них.

Экспериментальная часть проводилась в лаборатории клеточных исследований Научного парка Томского политехнического университета. Данный раздел включает в себя анализ условий труда и воздействия имеющихся вредных факторов, а также разработку защитных мер.

6.1 Производственная безопасность

6.1.1 Анализ выявленных вредных факторов

Все вредные и опасные факторы, воздействующие на работника лаборатории, можно классифицировать следующим образом [1] на факторы, порождаемые: физическими, химическими и биологическими свойствами материалов.

Перечень вредных и опасных факторов, возникающий при данных исследованиях в лаборатории, представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Возможные вредные и опасные факторы, возникающие в лаборатории при оценке цитотоксичности стабильных активных радикалов

Факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Нормативные документы
Недостаточная освещенность	СНиП 23-05-95. Естественное и искусственное освещение [2]
Отклонение показателей микроклимата в помещении	СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производствен. Помещений [3]
Превышение уровня шума	ГОСТ 12.1.003 – 83 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Шум. Общие требования безопасности [4]
Защита от токсикантов	ГН 2.2.5.3532–18. Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны [5]

6.1.1.1 Недостаточная освещенность

В лаборатории клеточных исследований присутствуют участки, на которых проводятся работы с высоким зрительным напряжением: подготовка клеточной линии к инкубированию, подсчет количества клеток с помощью камеры Горяева, посев клеток и внесение соединений в 96-луночный планшет а также выполнение колориметрических тестов. При длительном выполнении данных работ в условиях недостаточной освещенности, снижается зрительное восприятие лаборанта, возникают головные боли, даже развивается близорукость.

Нормы освещенности в помещениях для точных измерений и лабораториях химической промышленности, где происходит периодическое наблюдение за ходом производственного процесса при постоянном нахождении людей в помещении, согласно СНиП 23-05-95 [2] освещенность при системе общего освещения не должна быть ниже 300 Лк. При этом освещение должно быть комбинированным совмещенным. Это когда для общего освещения применяют и естественное, и искусственное освещения света, и вместе с этим используют местное освещение. Коэффициент пульсации не должен превышать 10 %.

Правильно спроектированное и выполненное освещение обеспечивает высокий уровень работоспособности, оказывает положительное психологическое действие на человека и способствует повышению производительности труда.

На рабочей поверхности должны отсутствовать резкие тени, которые создают неравномерное распределение поверхностей с различной яркостью в поле зрения, искажает размеры и формы объектов различия, в результате повышается утомляемость и снижается производительность труда.

Расчёт общего равномерного искусственного освещения горизонтальной рабочей поверхности выполняется методом коэффициента светового потока, учитывающим световой поток, отражённый от потолка и стен. Длина помещения $A = 5$ м, ширина $B = 3$ м, высота $H = 3,5$ м. Высота рабочей поверхности над

полом $h_p = 1,0$ м. В соответствии с разрядом зрительной работы согласно СНиП 23-05-95 [2] необходимо создать освещенность от 300 до 500 лк.

Площадь помещения:

$$S = A \cdot B,$$

где A – длина, м;

B – ширина, м.

$$S = 5 \cdot 3 = 15 \text{ м}^2$$

Коэффициент отражения свежепобеленных стен с окнами, без штор $\rho_c = 50\%$, свежепобеленного потолка $\rho_{п} = 70\%$. Коэффициент запаса, учитывающий загрязнение светильника, для помещений с малым выделением пыли равен $K_z = 1,5$. Коэффициент неравномерности для люминесцентных ламп $Z = 1,1$.

Выбираем лампу белой цветности ЛБ-40, световой поток которой равен $\Phi_{лд} = 2800$ Лм.

Выбираем светильники с люминесцентными лампами типа ОД – 2 – 40. Этот светильник имеет две лампы мощностью 40 Вт каждая, длина светильника равна 1230 мм, ширина – 266 мм.

Интегральным критерием оптимальности расположения светильников является величина λ , которая для люминесцентных светильников без защитной решётки равна 1,4; принимаем расстояние светильников от перекрытия (свес) $h_c = 0,5$ м.

Высота светильника над рабочей поверхностью определяется по формуле:

$$h = h_n - h_p,$$

где h_n – высота светильника над полом, высота подвеса,

h_p – высота рабочей поверхности над полом.

$$h_n = H - h_c.$$

Наименьшая допустимая высота подвеса над полом для двухламповых светильников ОД – 3,5 м.

Высота светильника над рабочей поверхностью определяется по формуле:

$$h = H - h_c - h_p = 3,5 - 0,5 - 1 = 2,0 \text{ м.}$$

Расстояние между рядами определяется по формуле:

$$L = \lambda \cdot h = 1,4 \cdot 2,0 = 2,8 \text{ м.}$$

Число рядов светильников в помещении:

$$N_b = B / L = 3 / 2,8 = 1,07 \approx 1.$$

Число светильников в ряду:

$$N_a = A / L = 5 / 2,8 = 1,8 \approx 2.$$

Общее число светильников:

$$N = N_a \cdot N_b = 1 \cdot 2 = 2.$$

Расстояние от светильников до стены определяется по формуле:

$$l = L / 3 = 2,8 / 3 = 0,93 \text{ м.}$$

Потребный световой поток группы люминесцентных ламп светильника определяется по формуле:

$$\Phi_{\Pi} = (E_H \cdot S \cdot K_3 \cdot Z) / (N \cdot \eta),$$

где E_H – нормируемая минимальная освещённость по СНиП 23-05-95, лк;

S – площадь освещаемого помещения, м²;

K_3 – коэффициент запаса, учитывающий загрязнение светильника;

Z – коэффициент неравномерности люминесцентных ламп;

N – число люминесцентных ламп в помещении;

η – коэффициент использования светового потока.

η определяем через индекс помещения:

$$i = \frac{S}{h \cdot (A+B)} = \frac{15}{2 \cdot (5+3)} = 0,94.$$

Коэффициент использования светового потока, показывающий какая часть светового потока ламп попадает на рабочую поверхность, для светильников типа ОД с люминесцентными лампами при $\rho_{\Pi} = 70 \%$, $\rho_C = 50\%$ и индексе помещения $i = 0,94$ равен $\eta = 0,48$.

Тогда $\Phi_{\Pi} = (E_{\text{н}} \cdot S \cdot K_3 \cdot Z) / (N \cdot \eta) = (300 \cdot 15 \cdot 1,5 \cdot 1,1) / (4 \cdot 0,48) = 3030,61$ Лм.

Делаем проверку выполнения условия:

$$-10\% \leq \frac{\Phi_{\text{ЛД}} - \Phi_{\Pi}}{\Phi_{\text{ЛД}}} \cdot 100\% \leq 20\%;$$

$$\frac{\Phi_{\text{ЛД}} - \Phi_{\Pi}}{\Phi_{\text{ЛД}}} \cdot 100\% = \frac{2800 - 3030,61}{2800} \cdot 100\% = -8,2\%.$$

Таким образом, мы получили, что необходимый световой поток не выходит за пределы требуемого диапазона. Теперь рассчитаем мощность осветительной установки:

$$P = 4 \cdot 40 = 160 \text{ Вт.}$$

На рисунке изображен план помещения и размещения светильников с люминесцентными лампами.

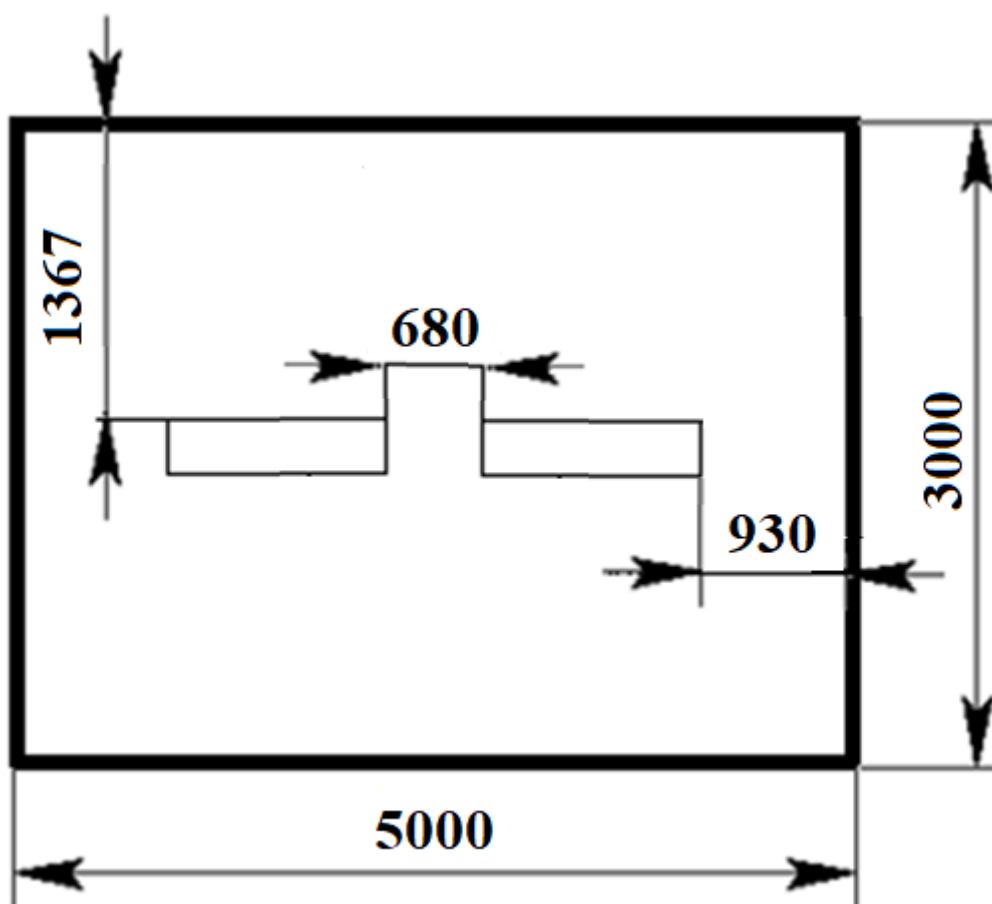


Рисунок 1 – План помещения и размещения светильников с люминесцентными лампами.

6.1.1.2 Отклонение показателей микроклимата в помещении

Несоответствие оптимальным микроклиматическим условиям является вредным фактором. К микроклиматическим параметрам воздушной среды в лаборатории относятся температура и относительная влажность воздуха, скорость движения воздуха относительно тела лаборанта. Регламентируются они СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений [3].

Проанализируем микроклимат в помещении, где находится рабочее место – лаборатория клеточных исследований. Лаборатория клеточных исследований относится к категории Ia. Оптимальные и допустимые значения параметров микроклимата в соответствии с СанПиН 2.2.4.548-96 приведены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2 – Оптимальные нормы микроклимата для категории работ IIa

Период года	Температура воздуха, °С	Относительная влажность воздуха, %	Скорость движения воздуха, м/с
Холодный	22-24	60-40	0,1
Теплый	23-25	60-40	0,1

Таблица 3 – Допустимые нормы микроклимата для категории работ IIa

Период года	Температура воздуха, С°	Относительная влажность воздуха, %	Скорость движения воздуха, м/с
Холодный	20-25	20-80	<0,1-
Теплый	21-28	20-80	<0,5

Общая площадь рабочего помещения составляет 15 м², объем составляет 52,5 м³. На основании документа Постановления Главного государственного санитарного врача РФ 2.2.3670-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к условиям труда» [6] нормы составляют 4,5 м² площади и 15 м³ объема помещения на одного человека. На экспериментальном участке находятся не более 2 человек, а рабочие операции

выполняет только 1 человек. Исходя из приведенных выше данных, можно сказать, что количество рабочих мест соответствует размерам помещения по санитарным нормам.

После анализа габаритных размеров рассмотрим микроклимат в комнате на экспериментальном участке. В качестве параметров микроклимата рассмотрим температуру, влажность воздуха, скорость движения воздуха.

На экспериментальном участке находится лабораторное оборудование, характеризующееся выделением пыли, эксплуатация которого приводит к превышению гигиенических нормативов в воздухе рабочей зоны с постоянными рабочими местами, поэтому рабочее место оснащено устройствами местной вытяжной и приточной вентиляции и возможностью естественного проветривания. Согласно нормам СНиП 41-01-2003 «Отопление, вентиляция и кондиционирование» [7] объем воздуха необходимый на одного человека в помещении с естественным проветриванием должен быть не менее 30 м³. В нашем случае объем воздуха на одного работающего человека составляет 52,5 м³, из этого следует, что дополнительная вентиляция не требуется. Параметры микроклимата поддерживаются в холодное время года за счет систем водяного отопления с нагревом воды до 95 °С, а в теплое время года – за счет проветривания.

По данным замеров температура воздуха в рабочей зоне экспериментального участка в теплый период года 21-23°С, в холодный период года 18-20°С, относительная влажность воздуха 60-75%, скорость движения воздуха 0,1 м/с.

Фактический уровень параметров микроклимата на рабочем месте соответствует требованиям Приказа Минтруда России № 33н от 24 января 2014 года с изменениями на 27 апреля 2020 года [8].

6.1.1.3 Превышение уровня шума

Одним из наиболее распространенных в производстве вредных факторов является шум. Он создается рабочим оборудованием, преобразователями напряжения, рабочими лампами дневного света, а также проникает снаружи.

Шум оказывает вредное воздействие на организм человека. Если кратковременный шум может только раздражить, то при длительном воздействии происходит снижение остроты слуха, повышение кровяного давления, снижение внимания и, следовательно, снижение работоспособности.

В лаборатории клеточных исследований находится оборудование, являющееся источником шума, к нему относятся: ламинарный бокс и центрифуга. В таблице представлены измеренные величины показателей шума на рабочем месте:

Таблица 3 – Измеренные величины показателей шума в лаборатории

Наименование рабочей зоны (точки измерения)	Рабочая операция	Уровень звука, дБ		Продолжительность операции, мин	
		Результаты измерений (не менее трех)	Эквивалентный уровень за операцию	Результаты наблюдений	Средняя
Микробиологическая лаборатория Каб. 201	Ламинарный бокс	47	46,3	60	62
		46		55	
		46		70	
	Центрифуга	53	51,3	3	3
		50		3	
		51		3	

Эквивалентный уровень звука на данном рабочем месте составляет 48,8 дБ. Нормативное значение, согласно ГОСТ 12.1.003 – 83 [4], для работников лаборатории, выполняющих умственную работу с часто получаемыми указаниями и акустическими сигналами, рекомендуемый уровень шума – 60 дБ, а предельно допустимый уровень – 82 дБА. Шум на рабочем месте не превышает предельно допустимый уровень звука, что соответствует требованиям Приказа Минтруда России № 33н от 24 января 2014 г. [8].

При значениях выше допустимого уровня необходимо предусмотреть средства индивидуальной защиты (СИЗ) и средства коллективной защиты (СКЗ) от шума.

Средства коллективной защиты:

- 1) устранение причин шума или существенное его ослабление в источнике образования;
- 2) изоляция источников шума от окружающей среды (применение глушителей, экранов, звукопоглощающих строительных материалов, например, шамотного кирпича);
- 3) применение средств, снижающих шум и вибрацию на пути их распространения.

Средства индивидуальной защиты:

- 1) применение спецодежды и защитных средств органов слуха: наушники, беруши, антифоны.

6.1.1.4 Защита от токсикантов

Работа с вредными веществами

Контакт с вредными веществами относится к факторам, порождаемым химическими свойствами находящихся в рабочей зоне веществ. Задачей защиты от химических негативных факторов является исключение или снижение до допустимых пределов попадания в организм человека вредных веществ, контакта с вредными или опасными объектами. Вредные вещества могут попадать в организм человека с вдыхаемым воздухом, питьевой водой, пищей, проникать через кожу.

В рабочей зоне необходимо обеспечить такие уровни негативных факторов, которые не вызывают ухудшения состояния здоровья человека, заболеваний. Для исключения необратимых изменений в организме человека необходимо ограничить воздействие негативных химических факторов предельно допустимыми концентрациями (далее – ПДК).

За время исследования выполнялись работы с применением диметилсульфоксида и этилового спирта. ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны и их классы опасности [5] представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Перечень вредных и опасных веществ, применяемых в исследовании

Вещество	Величина ПДК, мг/м ³	Характеристика	Класс опасности	Особенности воздействия на организм
Диметил-сульфоксид (ДМСО)	20	Бесцветная гигроскопичная жидкость	4	Пары при длительном воздействии вызывают головные боли и тошноту
Этиловый спирт ГОСТ 17299- 78 [47]	1000	Легковоспламеняющаяся бесцветная жидкость с характерным запахом	4	Пары при длительном воздействии раздражают оболочки глаз и носа, вызывают головные боли, сонливость и усталость

Лаборатория, снабжена приточно-вытяжной вентиляцией и вытяжным шкафом для защиты органов дыхания и слизистой оболочки глаз. Кроме того используются средства индивидуальной защиты: перчатки и халаты, для предотвращения попадания вредных веществ на кожу.

Работа с клеточными культурами

Лаборатория клеточных культур имеет ряд специфических опасностей, связанных с обращением и манипуляциями с клетками и тканями человека или животного, а также с токсичными, коррозийными или мутагенными растворителями и реагентами для клеточных культур. Распространенными опасностями являются разливы и брызги на кожу и слизистые оболочки, попадание внутрь при пипетировании и ингаляционное воздействие инфекционных аэрозолей.

Основная цель любой программы биобезопасности состоит в том, чтобы уменьшить или устранить воздействие потенциально вредных биологических агентов на работников лабораторий и внешнюю среду. Самым важным элементом безопасности в лаборатории клеточных культур является строгое соблюдение стандартных микробиологических практик и методов.

Международные инструкции по биологической безопасности подготовлены Центром по контролю и профилактики заболеваний (CDC), а также Всемирной организацией здравоохранения (WHO). Документ определяет четыре повышающихся уровня локализации, называемых уровнями биобезопасности (BSL) с 1 по 4, и описывает микробиологическую практику и меры предосторожности для соответствующего уровня риска, связанного с работой с определенным агентом.

Большинство лабораторий клеточных культур должны иметь, по крайней мере второй уровень безопасности (BSL-2). Данный уровень подходит для агентов умеренной степени риска, которые, как известно, вызывают заболевания человека различной степени тяжести при приеме внутрь, в результате перкутанного воздействия или воздействия на слизистую оболочку. Но точные требования зависят от используемой линии клеток и типа выполняемой работы.

Оборудование безопасности в лаборатории клеточных культур включает в себя первичные барьеры, такие как ламинарные боксы, закрытые контейнеры и другие средства инженерного контроля, предназначенные для удаления или сведения к минимуму воздействия опасных материалов, в сочетании со средствами индивидуальной защиты.

Ламинарный шкаф является наиболее важным оборудованием для обеспечения локализации инфекционных брызг или аэрозолей, образующихся в результате многих микробиологических процедур, а также для предотвращения заражения самой клеточной культуры.

Средства индивидуальной защиты образуют непосредственный барьер между персоналом и опасным агентом и включают такие средства

индивидуальной защиты, как перчатки, лабораторный халат, чехлы на обувь, сменную обувь, респираторы, щитки для лица, защитные очки.

Хоть в рамках данной работы исследования проводятся с безопасными линиями клеток человека и животных, но в лаборатории клеточных исследований обязательно соблюдаются следующие требования безопасности:

- надевается при входе и снимается при выходе из помещения спецодежда (халат, сменная обувь);
- работы с биологическими агентами ведутся только в перчатках;
- транспортируются биологический материал и использованная посуда в закрывающихся емкостях;
- дезинфицируется ламинарный шкаф до начала и после окончания работ 70%-ным этиловым спиртом;
- проводится влажная уборка с дезинфицирующим средством ламинарного шкафа, стен и пола помещений, в которых ведутся работы, не реже одного раза в 2 недели;
- обеззараживается воздух в рабочих помещениях ежедневно при помощи бактерицидных ламп в течение 30-40 минут.

6.1.2 Анализ выявленных опасных факторов

6.1.2.1 Поражение электрическим током

К опасным факторам можно отнести наличие в помещении большого количества аппаратуры, использующей однофазный электрический ток напряжением 220 В и частотой 50 Гц. В лаборатории отсутствуют условия, создающие повышенную или особую опасность, например, высокая температура, сырость или токопроводящие полы. Также в помещении постоянно или в течение длительного времени не хранятся агрессивные пары, газы, жидкости, не образуются отложения или плесень, разрушающие изоляцию и токоведущие части электрооборудования.

Лаборатория относится к помещению без повышенной опасности поражения электрическим током, согласно Правилам устройства

электроустановок [9]. Безопасными номиналами являются [10]: $I < 0,1 \text{ А}$; $U < (2 - 36) \text{ В}$; $R_{\text{зазем}} < 4 \text{ Ом}$.

Основные меры предотвращения электротравм в лаборатории – защита от прикосновения к находящимся под напряжением частям электрооборудования и применение защитного заземления [11].

В помещении применяются следующие меры защиты от поражения электрическим током: недоступность токоведущих частей для случайного прикосновения, все токоведущие части изолированы и ограждены. Недоступность токоведущих частей достигается путем их надежной изоляции, применения защитных ограждений (кожухов, крышек, сеток и т.д.), расположения токоведущих частей на недоступной высоте.

Каждому необходимо знать меры медицинской помощи при поражении электрическим током. В любом рабочем помещении необходимо иметь медицинскую аптечку для оказания первой медицинской помощи.

Поражение электрическим током чаще всего наступает при небрежном обращении с приборами, при неисправности электроустановок или при их повреждении.

Для освобождения пострадавшего от токоведущих частей необходимо использовать непроводящие материалы. Если после освобождения пострадавшего из-под напряжения он не дышит, или дыхание слабое, необходимо вызвать бригаду скорой медицинской помощи и оказать пострадавшему доврачебную медицинскую помощь:

- обеспечить доступ свежего воздуха (снять с пострадавшего стесняющую одежду, расстегнуть ворот);
- очистить дыхательные пути;
- приступить к искусственной вентиляции легких (искусственное дыхание);
- в случае необходимости приступить к непрямому массажу сердца.

Любой электроприбор должен быть немедленно обесточен в случае:

- возникновения угрозы жизни или здоровью человека;

- появления запаха, характерного для горячей изоляции или пластмассы;
- появления дыма или огня;
- появления искрения;
- обнаружения видимого повреждения силовых кабелей или коммутационных устройств.

Для защиты от поражения электрическим током используют средства коллективной защиты и средства индивидуальной защиты.

Средства коллективной защиты:

1. Заземление (зануление) источников электрического тока;
2. Использование щитов, барьеров, клеток, ширм, а также заземляющих и шунтирующих штанг, специальных знаков и плакатов.

Средства индивидуальной защиты:

1. Использование диэлектрических перчаток, изолирующих клещей и штанг, слесарных инструментов с изолированными рукоятками, указатели величины напряжения, калоши, боты, подставки и коврики.

6.1.2.2 Пожарная безопасность

По взрывопожарной и пожарной опасности помещения подразделяются на категории А, Б, В1-В4, Г и Д.

Согласно СП 12.13130.2009 «Определение категорий помещений, зданий и наружных установок по взрывопожарной и пожарной опасности» [12] лаборатория относится к категории ВП, в которых взрывоопасные пылевоздушные смеси могут образовываться только в случае производственных неисправностей. По степени огнестойкости данное помещение относится к 1-й степени огнестойкости по СНиП 2.01.02-85 [13].

Возникновение пожара при работе может быть по причинам как электрического, так и неэлектрического характера.

Причины неэлектрического характера:

- неисправность производственного оборудования и нарушение технологического процесса;
- халатное и неосторожное обращение с огнем (курение, оставление без присмотра нагревательных приборов, определение утечки газа с помощью открытого огня);
- неправильное устройство и неисправность вентиляционной системы;
- плохая огнезащита металлоконструкций;
- самовоспламенение или самовозгорание веществ.

Причины электрического характера:

- короткие замыкания, перегрузки, большие переходные сопротивления, искрение и электрические дуги, статическое электричество.

Для локализации или ликвидации загорания на начальной стадии используются первичные средства пожаротушения. Первичные средства пожаротушения обычно применяют до прибытия пожарной команды.

Огнетушители водо-пенные (ОХВП-10) используют для тушения очагов пожара без наличия электроэнергии. Углекислотные (ОУ-2) и порошковые огнетушители предназначены для тушения электроустановок, находящихся под напряжением до 1000В. Для тушения токоведущих частей и электроустановок применяется переносной порошковый огнетушитель ОП-5.

В общественных зданиях и сооружениях на каждом этаже должно размещаться не менее двух переносных огнетушителей. Огнетушители следует располагать на видных местах вблизи от выходов из помещений на высоте не более 1,35 м. Размещение первичных средств пожаротушения в коридорах, переходах не должно препятствовать безопасной эвакуации людей.

Для предупреждения пожара и взрыва необходимо предусмотреть:

- 1) специальные изолированные помещения для хранения и разлива легковоспламеняющихся жидкостей (ЛВЖ), оборудованные приточно-вытяжной вентиляцией во взрывобезопасном

исполнении – в соответствии с ГОСТ 12.4.021-75 [14] и СНиП 41-01-2003 [15];

- 2) специальные помещения (для хранения в таре пылеобразной канифоли), изолированные от нагревательных приборов и нагретых частей оборудования;
- 3) первичные средства пожаротушения на производственных участках (передвижные углекислые огнетушители ГОСТ 9230-77 [16], пенные огнетушители ТУ 22-4720-80 [17], ящики с песком, войлок, кошма или асбестовое полотно);
- 4) автоматические сигнализаторы (типа СВК-3 М 1) для сигнализации о присутствии в воздухе помещений предвзрывных концентраций горючих паров растворителей и их смесей.

Лаборатория полностью соответствует требованиям пожарной безопасности, а именно, наличие охранно-пожарной сигнализации, плана эвакуации, изображенного на рисунке 2, порошковых огнетушителей с поверенным клеймом, табличек с указанием направления к запасному (эвакуационному) выходу.



Рисунок 2 – План эвакуации

6.2 Экологическая безопасность

Важной характеристикой экологической безопасности является влияние химических и биологических отходов.

К химическим и биологическим отходам относятся:

- Неиспользованные и просроченные вещества
- Пролитые жидкости
- Загрязнённые вещества
- Использованные расходные материалы.

Все отходы лаборатории клеточных исследований представляют собой химические вещества разной степени токсичности. Утилизация отходов проходит путем ее сжигания приводит к серьезному загрязнению атмосферы, гидросферы и почвы токсичными веществами, а, следовательно, к серьезным проблемам и заболеваниям населения. В настоящее время в лаборатории разработаны мероприятия, направленные на уменьшение и предотвращение

негативного воздействия опасных отходов на окружающую среду. Перед сливом вредных веществ их необходимо очистить, обезвредить, с целью предотвращения негативного воздействия. Неорганические, органические и биологические отходы собираются отдельно, далее кислые и щелочные среды обезвреживаются, растворители регенерируются, а жидкий биоматериал обезвреживается дезинфицирующим раствором.

Чтобы сократить негативное воздействие твердых отходов, в виде бытового мусора, и твердого биоматериала класса Б (опасные / рискованные), образующихся в лаборатории клеточных исследований, выполняют последовательность действий:

1. Твердый биоматериал и контактирующие с ним предметы удаляют в мягкую упаковку (одноразовые пакеты, маркированные желтым цветом с надписью «медицинские отходы», закрепленные в урнах);
2. После заполнения пакета примерно на 3/4 из него удаляют воздух, и сотрудник, ответственный за сбор отходов, осуществляет его герметизацию;
3. Транспортирование всех видов отходов класса Б вне пределов медицинского подразделения осуществляют только в одноразовой упаковке после ее герметизации.

Сбор и утилизацию отходов производят специальные службы.

Сбор отходов осуществляется отдельно по их видам, классам опасности и другим признакам. Промышленные отходы, по ходу технологического процесса, в зависимости от класса опасности, пакуются в тару:

1 класс опасности (чрезвычайно опасные: ртутные лампы отработанные, люминесцентные ртутьсодержащие трубки отработанные и брак) – в герметичные емкости (контейнеры, бочки, цистерны);

2 класс опасности (высокоопасные: аккумуляторы свинцовые отработанные неразобранные с не слитым электролитом) – в надежно закрытой таре (полиэтиленовые мешки, пластиковые пакеты);

3 класс опасности (умеренно опасные: масла моторные отработанные и трансмиссионные отработанные);

4 класс опасности (малоопасные: мусор от бытовых помещений организаций, обтирочные материалы, бумажные отходы, пластмасса) – навалом, насыпью, в виде гряд.

6.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

Причиной чрезвычайной ситуации могут стать как несоблюдение работниками правил безопасности и нахождения в лаборатории, так и внешние неантропогенные и антропогенные влияния. Организационно-правовые нормы в области защиты от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера содержатся в Федеральном законе от 21 декабря 1994 г. № 68 [18].

Ошибочные действия сотрудников лаборатории клеточных исследований могут привести к антропогенным чрезвычайным ситуациям. Самым распространенным антропогенным ЧС является пожар.

Пожар может возникнуть в результате нерегламентированного хранения и транспортирования взрывчатых веществ, легковоспламеняющихся жидкостей, переохлажденных и нагретых жидкостей. В лаборатории клеточных исследований использование легковоспламеняющихся жидкостей происходит в малых количествах, поэтому возможный пожар может быть охарактеризован как локальный. Для его ликвидации необходимо воспользоваться огнетушителем, песком или асбестовым одеялом и сообщить руководителю.

Для предотвращения аварийных ситуаций в лаборатории клеточных исследований выполняются следующие требования:

1. Вход в биотехнологический блок посторонних лиц ограничен. Все сотрудники производят запись в журнале о начале и окончании своей работы.
2. При необходимости нахождения посторонних, они обязательно сопровождаются сотрудниками блока, их присутствие фиксируется записью в журнале;
3. Запрещено использовать материалы и средства личной гигиены, раздражающие кожу;

4. Запрещено пипетировать ртом и переливать жидкий материал через край сосуда;
5. Запрещено употреблять пищу и курить на территории лаборатории;
6. Запрещено сливать жидкие отходы в канализацию без предварительного обеззараживания.

Природная чрезвычайная ситуация – обстановка на определенной территории или акватории, сложившейся в результате возникновения источника природной чрезвычайной ситуации, который может повлечь или повлек за собой человеческие жертвы, ущерб здоровью людей и (или) окружающей природной среде, значительные материальные потери и нарушение условий жизнедеятельности людей.

Природные чрезвычайные ситуации обусловлены географическим расположением города Томска. Возможными опасными явлениями, приводящими к нарушению нормальной деятельности, гибели людей и разрушению материальных ценностей могут быть пожары, взрывы, разрушения зданий в результате разрядов атмосферного электричества, ураганов. Здание защищаются от прямых ударов молнии молнеприемниками, принимающими разряд на себя, заземлителями, служащими для отвода тока в землю и токопроводами, соединяющими молнеприемники и заземлители. В случае стихийного бедствия (урагана, землетрясения) необходимо отключить воду, электричество и покинуть помещение согласно плану эвакуации.

Возможными чрезвычайными ситуациями в Томске могут быть сильные морозы. Для Сибири в зимнее время года характерны морозы. Достижение критически низких температур приводит к авариям систем тепло- и водоснабжения, сантехнических коммуникаций и электроснабжения, приостановке работы. В этом случае при подготовке к зиме следует предусмотреть:

- 1) газобаллонные калориферы (запасные обогреватели);
- 2) дизель или бензоэлектродгенераторы;

- 3) запасы питьевой и технической воды на складе (не менее 30 л на 1 человека);
- 4) теплый транспорт для доставки работников на работу и с работы домой в случае отказа муниципального транспорта.

Их количества и мощности должно хватать для того, чтобы работа на производстве не прекратилась.

В связи с нестабильной международной обстановкой, массовыми террористическими актами, нужно предусмотреть возможности начала военных действий и связанных с ними нападений на объекты с использованием средств массового поражения. По сигналу «воздушная тревога» производится отключение воды и электроэнергии в лаборатории, затем организуется эвакуация работающих в лаборатории согласно плану эвакуации. При угрозе нападения по радиотрансляционной сети передают сигналы «Воздушная тревога», «Отбой воздушной тревоги», «Химическая тревога», «Радиационная опасность» и «Биологическая опасность».

Для исключения возможности несчастных случаев должны проводиться обучение и проверка знаний работников о требованиях безопасности труда.

6.4 Перечень нормативно-технической документации

1. ГОСТ 12.0.003-2015 ССБТ. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация;
2. СНиП 23-05-95 Естественное и искусственное освещение;
3. СанПиН 2.2.4.548–96 Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений;
4. ГОСТ 12.1.003 – 83 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Шум. Общие требования безопасности;
5. ГН 2.2.5.3532-18. Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны;
6. СП 2.2.3670-20 Санитарно-эпидемиологические требования к условиям труда;
7. СНиП 41-01-2003 Отопление, вентиляция и кондиционирование;

8. Приказа Минтруда России № 33н "Об утверждении Методики проведения специальной оценки условий труда, Классификатора вредных и (или) опасных производственных факторов, формы отчета о проведении специальной оценки условий труда и инструкции по ее заполнению" от 24 января 2014 года с изменениями на 27 апреля 2020 года;

9. Правила устройства электроустановок. Седьмое издание;

10. ГОСТ Р 12.1.019-2009 Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты;

11. ГОСТ 12.4.154-85 ССБТ. Устройства экранирующие для защиты от электрических полей промышленной частоты;

12. СП 12.13130.2009 Определение категорий помещений, зданий и наружных установок по взрывопожарной и пожарной опасности;

13. СНиП 2.01.02-85 Противопожарные нормы;

14. ГОСТ 12.4.021-75 ССБТ. Системы вентиляционные;

15. СНиП 41-01-2003 Отопление, вентиляция и кондиционирование;

16. ГОСТ 9230-77 Огнетушители СО(2) (углекислотные) передвижные. Технические условия;

17. ТУ 22-4720-80 Огнетушитель химический воздушно-пенный ОХВП-10;

18. Федеральный закон «О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера» от 21 декабря 1994 г. № 68.

Заключение

Проведенные эксперименты не выявили статистически значимого цитотоксического действия у изучаемых гомеопатических препаратов в диапазоне разведений 3С-1000С на рост, пролиферацию и морфологию опухолевых клеточных культур рака молочной железы, рака простаты и лимфобластного лейкоза в условиях *in vitro*. Полученные результаты, однако, не позволяют сделать окончательного вывода об отсутствии потенциального эффекта данных препаратов *in vivo*, поскольку заявляемые механизмы их действия сложны и не всегда могут быть реализованы в модельных условиях *in vitro*. Для этого необходимы дальнейшие разносторонние исследования, в том числе, касающиеся оценки клинической эффективности гомеопатических препаратов, которую планируется провести на следующем этапе данной научной работы.

Список публикаций

Принята в печать статья: О. Botkina, Е. Plotnikov. Cytotoxic Effects of Homeopathic Preparations on Human Tumor Cells *in vitro*. Current Bioactive Compounds. 2022. In press

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Rodrigues-Neto, J. F., Figueiredo, M. F. S., & Faria, A. A. de. Prevalence of the use of homeopathy by the population of Montes Claros, Minas Gerais, Brazil// Sao Paulo Medical Journal. – 2009. - № 127(6). – P. 329–334.
2. Bagot, J. L., Legrand, A., & Theunissen, I. Use of Homeopathy in Integrative Oncology in Strasbourg, France: Multi-center Cross-Sectional Descriptive Study of Patients Undergoing Cancer Treatment// Homeopathy : the journal of the Faculty of Homeopathy.- 2021.- № 110(3). - P. 168–173.
3. Frass M, Linkesch M, Banyai S, Resch G, Dielacher C, Löbl T, Endler C, Haidvoogl M, Muchitsch I, Schuster E. Adjunctive homeopathic treatment in patients with severe sepsis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in an intensive care unit// Homeopathy. - 2005. - Apr; 94(2). - P. 75-80.
4. Frass M, Lechleitner P, Gründling C, Pirker C, Grasmuk-Siegl E, Domayer J, Hochmair M, Gaertner K, Duscheck C, Muchitsch I, Marosi C, Schumacher M, Zöchbauer-Müller S, Manchanda RK, Schrott A, Burghuber O. Homeopathic Treatment as an Add-On Therapy May Improve Quality of Life and Prolong Survival in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: A Prospective, Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind, Three-Arm, Multicenter Study// Oncologist. - 2020. - Dec;25(12). – P. 1930-1955.
5. Shang A, Huwiler-Müntener K, Nartey L, et al. Are the clinical effects of homeopathy placebo effects? Comparative study of placebo-controlled trials of homeopathy and allopathy// Lancet. – 2005. – V. 366. – P. 726–32.
6. Ernst E. Classical homeopathy versus conventional treatments: A systematic review// Perfusion. - 1999. - V.12. - P.13–15.
7. Ernst, E. A systematic review of systematic reviews of homeopathy// British Journal of Clinical Pharmacology. – 2002. – V. 54(6). – P. 577–582.
8. Владимирская Е.Б., Мильман В.Д. Механизмы проведения сигналов в клетке. Факты и гипотезы. Клин. онкогематол. 2015; 8(3): 248–254. : Elena B. Vladimirska, Vitali D. Mil'man. Mechanisms of Signal Transduction in Cells. Facts and Hypotheses// Klin. Onkogematol. – 2015. - 8(3). – P. 248–254. (In Russ.)

9. Montagnier L, Aïssa J, Ferris S, Montagnier JL, Lavallée C. Electromagnetic signals are produced by aqueous nanostructures derived from bacterial DNA sequences// *Interdiscip Sci.* - 2009. - Jun;1(2). – P. 81-90.
10. Ганеман С. Органон врачебного искусства. Шестое издание. – Санкт – Петербург: Свое издательство, 2018. – 500с.
11. Engel, G. (1977). The need for a new medical model: a challenge for biomedicine. *Science*, 196(4286), 129–136. doi:10.1126/science.847460
12. Колесников, Д. Б., Рапопорт, С. И., & Вознесенская, Л. А. (2014). Современные взгляды на психосоматические заболевания. *Клиническая медицина*, 92 (7), 12-18
13. Kleijnen J, Knipschild P, ter Riet G. Clinical trials of homeopathy. *BMJ*. 1991;302:316–323.
14. Boissel JP, Cucherat M, Haugh M, Gauthier E. Critical literature review on the effectiveness of homeopathy: overview of data from homeopathic medicine trials. In: *Homeopathic Medicine Research Group Report. Commission of the European Communities, Directorate-General XII – Science, Research and Development, Directorate E – RTD Actions: Life Sciences and Technologies – Medical Research*. Brussels: Commission of the European Communities; 1996.
15. Cucherat M, Haugh MC, Gooch M, Boissel JP. Evidence of clinical efficacy of homeopathy – A meta-analysis of clinical trials. *Eur J Clin Pharmacol*. 2000;56:27–33.
16. Linde K, Clausius N, Ramirez G, Melchart D, Eitel F, Hedges LV, Jonas WB. Are the clinical effects of homeopathy placebo effects? A meta-analysis of placebo-controlled trials. *Lancet*. 1997;350:834–843.
17. Mathie, R. T., Ramparsad, N., Legg, L. A., Clausen, J., Moss, S., Davidson, J. R., Messow, C. M., & McConnachie, A. (2017). Randomised, double-blind, placebo-controlled trials of non-individualised homeopathic treatment: systematic review and meta-analysis. *Systematic reviews*, 6(1), 63.
18. Linde K, Melchart D. Randomized controlled trials of individualized homeopathy: a state-of-the-art review. *J Altern Complement Med*. 1998;4:371–388.

19. Mathie RT, Lloyd SM, Legg LA, Clausen J, Moss S, Davidson JRT, Ford I. Randomised, placebo-controlled, trials of individualised homeopathic treatment: systematic review and meta-analysis. *Syst Rev.* . 2014;3:142.
20. Кремнёва Лидия Федоровна, Козловская Галина Вячеславовна, Крылатова Татьяна Александровна Современная тенденция терапии - сверхмалые концентрации лекарственных препаратов (аналитический обзор) // *Российский психиатрический журнал.* 2014. №2.
21. Matusiewicz R. Wirksamkeit von Engystol N bei Bronchialasthma unter kortikoidabhängiger Therapie. *Biologische Medizin* 1995;24:242-246;
22. Guimarães, F. S., Abud, A. P., Oliveira, S. M., Oliveira, C. C., César, B., Andrade, L. F., Donatti, L., Gabardo, J., Trindade, E. S., & Buchi, D. F. (2009). Stimulation of lymphocyte anti-melanoma activity by co-cultured macrophages activated by complex homeopathic medication. *BMC cancer*, 9, 293
23. Varshney, J., & Ram Naresh. (2004). Evaluation of a homeopathic complex in the clinical management of udder diseases of riverine buffaloes. *Homeopathy*, 93(1), 17–20.
24. Freitas LAS, Goldenstein E, Sanna OM. The indirect doctorpatient relationship and the homeopathic treatment of asthma in children. *Revista de Homeopatia* 1995;60(2):26-31;
25. Sarah Brien, Laurie Lachance, Phil Prescott, Clare McDermott, George Lewith, Homeopathy has clinical benefits in rheumatoid arthritis patients that are attributable to the consultation process but not the homeopathic remedy: a randomized controlled clinical trial, *Rheumatology*, Volume 50, Issue 6, June 2011, Pages 1070–1082
26. Chikramane PS, Suresh AK, Bellare JR, Kane SG. Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: a nanoparticulate perspective. *Homeopathy* 2010;99:231–242.
27. Elia, V.; Baiano, S.; Duro, I.; Napoli, E.; Niccoli, M.; Nonatelli, L. Permanent physico-chemical properties of extremely diluted aqueous solutions of homeopathic medicines. *Homeopathy*, 2004, 93(3),144-50
28. Lo, S.Y. Anomalous state of ice. *Mod. Phys. Lett. B.*, 1996, 10, 909–919.

29. Lo, S.Y.; Chong, L.W.; Tianzhang, L.; Hua, L.H.; Geng, X. Physical properties of water with IE structures. *Mod. Phys. Lett. B.*, 1996, 10, 921-930.
30. Rey, L. Thermoluminescence of ultra high dilutions of lithium chloride and sodium chloride. *Physica A*, 2003, 323, 67-74.
31. Samal, S.; Geckeler, K.E. Unexpected solute aggregation in water on dilution. *Chem. Commun. (Camb.)*, 2001, 7(21), 2224-5.
32. Michael, J.; Singh, S.; Sadhukhan, S.; Nath, A.; Kundu, N.; Magotra, N.; Dutta, S.; Parewa, M.; Koley, M.; Saha, S. Efficacy of individualized homeopathic treatment of insomnia: Double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Complement. Ther. Med.*, 2019, 43, 53-59.
33. Henrique da Silva, G.; Barros, P.P.; Silva Gonçalves, G.M.; Landi, M.A. Hepatoprotective effect of *Lycopodium clavatum* 30CH on experimental model of paracetamol-induced liver damage in rats. *Homeopathy*, 2015, 104(1), 29-35.
34. Hofbauer, R.; Pasching, E.; Moser, D.; Frass, M. Heparin-binding epidermal growth factor expression in KATO-III cells after *Helicobacter pylori* stimulation under the influence of *strychnos Nux vomica* and *Calendula officinalis*. *Homeopathy*, 2010, 99(3), 177-82.
35. Arruda-Silva, F.; Bellavite, P.; Marzotto, M. Low-dose *Drosera rotundifolia* induces gene expression changes in 16HBE human bronchial epithelial cells. *Sci. Rep.*, 2021, 11(1), 2356.
36. Arora, S.; Aggarwal, A.; Singla, P.; Jyoti, S.; Tandon, S. Anti-proliferative effects of homeopathic medicines on human kidney, colon and breast cancer cells. *Homeopathy*, 2013, 102(4), 274-82.
37. Valle, A.; Aguiar, L.R.; Brunel, H.D.; Malard, P.F.; Andrade, R.V. Analysis of the performance of the ultra-diluted *Viscum album* in cultivation of mesenchymal stem cells and mammary adenocarcinoma cells pmc-42 and mcf-7 . *Int. J. Hom. Sci.*, 2020, 4(2), 279-283.
38. Khan, S.; Nayak, D.; Khurana, A.; Manchanda, R.K.; Tandon, C.; Tandon, S. In Vitro Assessment of Homeopathic Potencies of *Hydrastis canadensis* on Hormone-Dependent and Independent Breast Cancer. *Homeopathy*, 2020, 109(4), 198-206.

39. Zimmerman H.J. Hepatotoxicity: The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. – 1999. – 789 p.
40. Sturgill M.G., Lambert G.H. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clinical Chemistry*. 1997;43, 8(B): 1512-26
41. Деев Р.В., Билялов А.И., Жампеисов Т.М. Современные представления о клеточной гибели // *Гены и клетки*. 2018. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennyye-predstavleniya-o-kletochnoy-gibeli> (дата обращения: 06.06.2022).
42. Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267: 1457-62.
43. Ярилин А.А. Апоптоз и его роль в иммунных процессах. *Иммунология*. 1996; № 6: 10-23.
44. Vaux D.T. Apoptosis Timeline. *Cell Death and Diff*. 2002; 9: 35-54.
45. Lu Q.E., Rounds S. Focal adhesion kinase and endothelial cell apoptosis. *Microvasc. Res*. 2012; 83(1): 56-63
46. Vanden B.T., Linkermann A., Jouan-Lanhouet S. Regulated necrosis the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2014; 15(2): 135-47
47. Gerlier D., Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation // *Jour. of Immun. Methods* – 1986, Vol. 94(1-2), P.57–63
48. Maines M. D. Heme Oxygenase 1 Transgenic Mice as a Model to Study Neuroprotection // *Red. Cell Biol. and Gen. Part B* – 2002, P.374–388
49. Gonzalez R.J., Tarloff J.B. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity // *Toxicol. in Vitro* – 2001. – Vol. 15. – P. 257–259
50. Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays // *International Journal of Pharmaceutics* - 2005. – Vol. 288. – P. 369–376.

51. Czekanska E.M. Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye // *Methods Mol Biol.* - 2011. – Vol. 740. – P. 27-32. 22.
52. Magnani E., Bettini E. Resazurin detection of energy metabolism changes in serum-starved PC12 cells and of neuroprotective agent effect // *Brain Res. Protoc.* - 2000. – Vol. 5. – P. 266–272
53. Erikstein B.S., Hagland H.R., Nikolaisen J., Kulawiec M., Singh K.K., Gjertsen B.T., Tronstad K.J. Cellular stress induced by resazurin leads to autophagy and cell death via production of reactive oxygen species and mitochondrial impairment // *J. Cell Biochem.* - 2010. – Vol. 111, № 3. – P. 574-584
54. Präbst K., Engelhardt H., Ringgeler S. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin // *Cell Viability Assays* – 2017, Vol. 1601, P.1–17
55. Burnett J.Compton. Tumors of the breast and their treatment and cure by medicines. - London: James Epps&Co., 170 Piccadilly and 48 Threadneedle Street, 1888. - 234p. ;
56. Clarke John H. The Cure of Tumours by Medicines with especial reference to the cancer nosodes. – London, England: James Epps&Co., 48 Threadneedle Street and 60 Jermyn Street 1908. – 213p
57. Frenkel M, Mishra BM, Sen S, Yang P, Pawlus A, Vence L, Leblanc A, Cohen L, Banerji P, Banerji P. Cytotoxic effects of ultra-diluted remedies on breast cancer cells // *Int J Oncol.* – 2010. - Feb;36(2). – P. 395-403
58. Yadav R, Jee B, Rao KS. How homeopathic medicine works in cancer treatment: deep insight from clinical to experimental studies// *J Exp Ther Oncol.* - 2019. - Jan;13(1). – P. 71-76
59. Ernst E. Homeopathy for cancer? // *Curr Oncol.* - 2007. -14(4). – P.128-130
60. Milazzo S, Russell N, Ernst E. Efficacy of homeopathic therapy in cancer treatment// *Eur J Cancer.* – 2006. - Feb;42(3). – P. 282-9
61. MacLaughlin BW, Gutsmuths B, Pretner E, Jonas WB, Ives J, Kulawardane DV, Amri H. Effects of homeopathic preparations on human prostate cancer growth in cellular and animal models// *Integr Cancer Ther.* – 2006. - Dec;5(4).- P. 362-72

62. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Сверхслабые воздействия химических соединений и физических факторов на биологические системы// Биофизика. - 2004; 49: 551–64. [Burlakova E.B., Konradov A.A., Mal'tseva E.L. Hyperweak effects of chemical compounds and physical factors on biological systems. Biofizika. 2004. – V. 49. - P. 551–64. (In Russ.)
63. Montagnier L, Aïssa J, Ferris S, Montagnier JL, Lavallée C. Electromagnetic signals are produced by aqueous nanostructures derived from bacterial DNA sequences// Interdiscip Sci. - 2009. - Jun;1(2). – P. 81-90
64. Бурлакова Е.Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности// Российский химический журнал, том XLIII, сс. 3-11
65. Ф. А. Аббасов Влияние ряда факторов на выживаемость при метастазах злокачественной фиброзной гистиоцитомы // Биомедицина (Баку). 2005. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-ryada-faktorov-na-vyzhivaemost-pri-metastazah-zlokachestvennoy-fibroznoy-gistiotsitomy> (дата обращения: 25.05.2022).
66. Ф. А. Аббасов Выживаемость при метастазах саркомы неясного генеза // Биомедицина (Баку). 2004. №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vyzhivaemost-pri-metastazah-sarkomy-neyasnogo-geneza> (дата обращения: 25.05.2022)
67. Керчелаева С.Б., Сметник А.А., Беспалов В.Г. Мастопатия и профилактика рака молочной железы как междисциплинарная проблема // РМЖ. Мать и дитя. 2016. №15. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mastopatiya-i-profilaktika-raka-molochnoy-zhelezy-kak-mezhdistsiplinarnaya-problema> (дата обращения: 25.05.2022)

Приложение А

Раздел 1

Literature review

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ91	Боткина Ольга Юрьевна		

Консультант ИШХБМТ:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ИШХБМТ	Плотников Евгений Владимирович	к.Х.Н.		

Консультант – лингвист отделения иностранных языков ШБИП:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОИЯ	Зяблова Наталия Николаевна	к.ф.н.		

1.1 Basic principles of homeopathy

More than 200 years ago, S. Hahnemann proposed the homeopathic method of treatment, which is still popular all over the world. The philosophical aspects of homeopathy deserve special attention. According to Hahnemann's ideas, in addition to the material body, man is endowed with a certain spiritual life force (immaterial essence). When healthy, it animates the body and maintains harmonious vitality "so that our eternal spirit, endowed with reason, may freely dispose of this living, healthy instrument for the higher purposes of our existence [10]. The causes of disease, according to Hahnemann, are not material (which echoes George Engel's concept of the biopsychosocial model of disease development [11] and the main postulates of psychosomatics - a modern trend in medical psychology) [12].

Through the spiritual influences of pathogenic agents, our spiritual life force becomes diseased and, similarly, only spiritual (dynamic) exposure to medicine can restore health again. A life force disorder reveals itself as a set of symptoms, on the basis of which the homeopathic doctor selects a suitable (similar) medicine. Each medication must be tested (pruvings) beforehand on healthy people in order to understand the specifics of its inherent effects (its characteristic symptoms).

The preparations that have undergone pruvings, with their detailed descriptions, are entered by Hahnemann and his followers into «Materia Medica». In order to select the most similar drug to the patient, the homeopathic physician conducts an interview (anamnesis collection), examination, objective examination of the patient, after which he "translates" all the collected symptoms into the "Repertory" (a collection of symptoms classified by headings, with a list of drugs corresponding to them). The drug that "closes" most of the symptoms is the most similar and is prescribed to the patient.

According to Hahnemann, in order to achieve the cure of a disease, it is only necessary to eliminate the totality of the symptoms that are produced by the affected

vital force. Once the totality of the symptoms has disappeared, the affected vital force, in other words, the internal and external disease state as a whole, is also eliminated.

Assignment to a single symptom (several symptoms) "not only failed to achieve any useful results, but also caused much harm. A single symptom is as much the whole disease as a foot is a person" [10].

The prescribed (similar) drug, according to Hahnemann, creates in the body an artificial disease, similar in symptoms to the patient's own, but endowed with greater power. "A weaker dynamic lesion is forever destroyed in a living organism by a stronger one, if the latter (differing in its nature) is extremely similar to the former in its manifestations" [10].

Thus, the basic principles of homeopathy can be identified:

- principle of similarity (*similia similibus curantur*): the set of the patient's symptoms should be as similar as possible to the symptoms of the prescribed drug described for it in *Materia Medica*;

- low-dose principle (multiple dilution);

- the principle of potentiation (dynamization, or successive shaking of the solution at each dilution);

- principle of drug testing

testing a homeopathic remedy on healthy individuals, followed by analysis of their symptoms in order to determine which symptoms are most characteristic of the remedy.

Only a preparation made according to Hahnemann can be considered homeopathic.

1.2 Problems of Homeopathy

Research in homeopathy has its own difficulties: first, there is no unified system of education in homeopathy; at the same time, there are different schools, many of which do not follow exactly the principles formulated by the founder of homeopathy S. Secondly, not all highly diluted substances can be classified as homeopathic, for this purpose they must be dynamized and pruwed; Third, there are no generally accepted research protocols, which makes it difficult to conduct a comparative analysis of trials described by different authors; fourth, the researcher, often not being a homeopath himself, is far from having an idea about the correct prescription of a drug; fifth, a drug will be effective only if the principle of similarity is followed, i.e., it must be chosen as precisely as possible according to the symptoms of a particular patient (which requires a highly qualified homeopath).

It should also be remembered that for the successful cure of a chronic pathology, a single homeopathic remedy is usually not enough; a sequential prescription of several drugs is required (in increasing dilutions - according to the Kent scale), each of which will be the most suitable for the patient (as a result of repertorization of symptoms) at a certain time interval and will play its important role in the final result. All of the above problems often make it difficult to correctly interpret the data obtained in homeopathic studies

1.3 Modern Homeopathy Law

The use of homeopathic method of treatment is allowed by Russian legislation, is legally justified and regulated by the Order of the Ministry of Health and Medical Industry of the Russian Federation № 335 from 29.11.95 "On the use of homeopathy in practical health care".

Certification rules, production of homeopathic remedies are regulated by the Russian Federal Law of 22.06.98 № 86-FZ "On Drugs", the State Register of Medicines (annual publication), the General Pharmacopoeial Articles and Pharmacopoeial Articles of Enterprises on raw materials, homeopathic matrix tinctures and medicines.

In April 2017, the General Prosecutor's Office of the Russian Federation analyzed the normative legal acts in the sphere of health protection and circulation of medicines, regulating the issues of homeopathic methods of treatment. The results showed that the existing normative acts in the area in question allow the use of homeopathic treatment methods in practical medicine.

The supervisory agency's response also noted that the memorandum adopted by the Pseudoscience Commission is not binding. "Adopted by the Commission on Combating Pseudoscience and Falsification of Scientific Research under the Presidium of the RAS, Memorandum No. 2 "On the Pseudoscience of Homeopathy" is not a normative act, mandatory for execution. The provisions of the Memorandum are of recommendatory character where the position of individual scientists is stated", - is written in the official reply of the General Prosecutor's Office.

1.4 Studies on the Effectiveness of Homeopathic Medicines

In the currently available scientific literature one can find data both confirming the effectiveness of homeopathic treatment [5,6] and claiming that the clinical effects of homeopathy are nothing more than placebo effect [7,8,9].

The authors of three comprehensive reviews of homeopathic randomized controlled trials (RCTs) reflecting a wide range of clinical conditions came to the cautious conclusion that a homeopathic intervention is probably different from a placebo [13,14,15].

The results of the meta-analysis [16] also did not support the hypothesis that the clinical effects of homeopathy are entirely due to placebo.

[5] found "weak evidence for a specific effect of homeopathic remedies ... consistent with the notion that the clinical effects of homeopathy are placebo effects."

Above analyzed the results of RCTs in which homeopathy was prescribed individually, together with the results of studies in which nonindividualized

homeopathic prescriptions took place (where all subjects, regardless of the variety of symptoms they had within the same nosology, received the same homeopathic remedy). Obviously, such heterogeneity can lead to distorted results.

Nevertheless, some studies of complex homeopathic remedies suggest their effectiveness in people.

In a meta-analysis, which studied only RCTs with non-individualized homeopathic prescriptions, the quality of studies was generally poor, which compromises the reliability of the assessment of treatment effect. The results obtained in this work do not allow us to reject the null hypothesis that the effect of treatment using non-individualized homeopathic remedies is indistinguishable from the placebo effect.

There were also two systematic reviews with meta-analysis of RCTs, where homeopathic medicines were prescribed individually: in 1998 [18] and in 2014 [19]. In the latter, there is a small statistically significant effect of individual homeopathic treatment. The authors also conclude that new high-quality RCTs are needed to improve the level of evidence and clarity of data interpretation.

In general, the analysis of the scientific literature in the field of homeopathy showed that the general word "homeopathy" refers to both monopreparations and complex preparations that include several components [20], while, following the logic of S. Hahnemann, this can only be one drug [10].

However, some studies of complex homeopathic remedies show their effectiveness in humans [21,22] and animals [23], while others show placebo-comparable effects [24].

1.5 Possible mechanisms of homeopathy action

The absence of single molecule in 12C homeopathic dilutions is the basis for denying the possibility of any homeopathy effects on living organisms for many scientists. While other researchers, based on the accumulated data and observed

patterns, put forward various hypotheses regarding the mechanisms of homeopathy action. From the point of view of S. Hahnemann, the mechanisms of homeopathic medicines action cannot be explained with the help of chemistry, physics or mathematics, because “substances that are used as medicines are medicines insofar as they each have their own specific energy to change the state of a person through dynamic, spiritual influences perceived by sensitive nerve fibers on the spiritual life principle that controls the functions of the body” [10]. But it is worth taking into account that Hahnemann lived more than two centuries ago, and since then scientific methods of research have undergone significant changes.

Thus, a group of scientists from India showed in their study using transmission electron microscopy that homeopathic dilutions of Aurum metallicum and Cuprum 30C and 200C contain nanoparticles [13], which could explain their biological effects. There are also reports by a number of researchers about the difference between the physicochemical properties of highly dilute solutions and the properties of pure unpurified water, despite the identical chemical composition of the two liquids [14,15,16,17]. In scientific work [13], the following paradox was noted: the size of clusters of fullerene cyclodextrin, β -cyclodextrin, sodium chloride, sodium guanosine monophosphate, and DNA oligonucleotide increased with decreasing concentration of solutions. Perhaps, the study of the phenomena of cluster-cluster aggregation in aqueous solutions of various substances will allow in the future to reveal the mechanisms of action of homeopathic medicines.

However, despite these findings and literature data indicating an improvement in clinical parameters in patients [3,4,9 or 3,4,16], a change in the amount of biologically active substances in the body (for example, hepatic transaminases) [10 or 17], as well as an effect on gene expression [11 ,12 or 18,19] in response to homeopathic influence, there is still no clear understanding and confirmed mechanisms of homeopathy influence on living organisms. In primary studies, in vitro cell models are widely used to assess the direct cytotoxic effect of various substances. There are few publications devoted to the study of the cytotoxicity of

homeopathic preparations in relation to cell cultures, in particular, kidney, colon and breast cancer cells [14,15,20]. Thus, in [13 or 20], the cytotoxic effect of the homeopathic preparation Hydrastis on the MCF-7 cells of hormone-dependent breast cancer was shown.

1.6 Cytotoxicity and its analysis methods

Cytotoxicity is the ability of physical, chemical or biological factors to cause pathological changes in the cell, as a result of which the cell cycle is disrupted, or the cell dies [39,40]. Without dwelling in detail on the description of all possible ways of cell death [41], two main ones can be distinguished - necrosis and apoptosis [42].

Apoptosis is programmed cell death, during which the cell fragments into individual apoptotic corpuscles bounded by the plasma membrane. Apoptotic corpuscles are phagocytosed by macrophages or neighboring cells without the development of an inflammatory response, this process is called efferocytosis. In apoptosis, it consists of dead cells being removed before their membrane integrity is compromised and their contents can enter the surrounding tissues. Thus, the surrounding cells are not damaged by enzymes, oxidants, inflammatory mediators and other intracellular components, and no zone of inflammation is formed around the dead cells.

Apoptosis, depending on the pathways of development, can be: external - carried out through the surface receptors of cell death - and internal - passing through a chain of mitochondrial reactions [44]. The first is characteristic for physiological tissue histogenesis, and the second is associated with mitochondrial damage in pathology. Apoptosis plays an important role for the organism as a whole, maintaining cellular homeostasis, removing genetically defective cells and thereby ensuring the correct ratio of the number of different cell types [45]. Internal apoptosis pathway develops due to intracellular "stresses": exposure to reactive oxygen species, DNA damage, cytosolic Ca^{2+} overload, etc., as a result of which the integrity of

mitochondrial membranes (first of all - external) is broken, or highly permeable ion channels are opened. Damaged organelles are compartmentalized, forming apoptotic corpuscles, which are further phagocytized.

Necrosis is a pathological condition characterized by irreversible changes in the tissue with destruction of its cells under the condition of preserving the viability of the organism as a whole. It should be noted that morphological manifestations of necrosis on the light-optical level - karyopiknosis, karyorexis, karyolysis, autolysis - appear after the actual cell death in a few tens of hours or even days.

The initiation of this type of cell death occurs as a result of exposure to extreme and intensive factors for a time sufficient for formation of irreversible changes (disruption of the integrity of cell membrane structures - mitochondrial membranes, plasmalemma, karyolemma). Rupture of membranes is considered a reliable sign of necrosis.

Necrotized cells undergo autolysis - destruction by intracellular proteolytic enzymes. Necrosis is usually accompanied by the development of inflammation (more often exudative) [46.].

To determine the cytotoxicity of substances, various in vitro tests are used, among which, depending on the mechanism of cell damage, three groups can be distinguished:

1. Definition of the plasma membrane damage:

a) Absorption of dyes:

- trypan blue;

- propidium iodide (propidium iodide).

b) Release of radioactive or fluorescent labels:

radioactive isotopes:

- [⁵¹Cr], [³H] - thymidine;
- [³H]-proline;
- [³⁵S], [⁷⁵Se] - methionine;
- 5-[¹²⁵I]-2-deoxy-uridine;

fluorescent dyes:

- fluorescein and its derivatives.

c) Exit of cytoplasmic enzymes:

- lactate dehydrogenase.

2. Determination of metabolic activity:

a) Change in energy metabolism:

- tetrazolium salts (MTT, XTT, WST-1);
- resazurin and its derivatives (Alamar blue);
- neutral red.

b) Violation of intracellular calcium homeostasis:

- ethers of acetoxymethyl (Flou4 and others).

c) Activation of free-radical processes in the cell:

- pH indicators (fluorescein and its derivatives).

d) Synthesis of heat shock proteins.

3. Determination of cell proliferation:

a) Determination of new cell colonies (ST1);

b) Measurement of the level of DNA synthesis (radioactive labels);

c) Measurement of enzymes that regulate the cell cycle (CDK - kinases).

Thus, the evaluation criteria for cytotoxicity and cell growth suppression in these tests are: cell membrane integrity, mitochondrial activity, cell metabolism, total protein synthesis, and cell proliferation.

Below we will describe in more detail the tests we used in this work to determine the cytotoxic activity of homeopathic drugs against human cancer cell cultures.

1.6.1 MTT test

The MTT test is a colorimetric analysis method based on the ability of living cell mitochondrial dehydrogenases to reduce yellow 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) into purple-blue crystals formazan soluble in DMSO (Figure 1). The method is widely used in assessing the cytotoxicity of various substances, as well as in the screening of anticancer drugs.

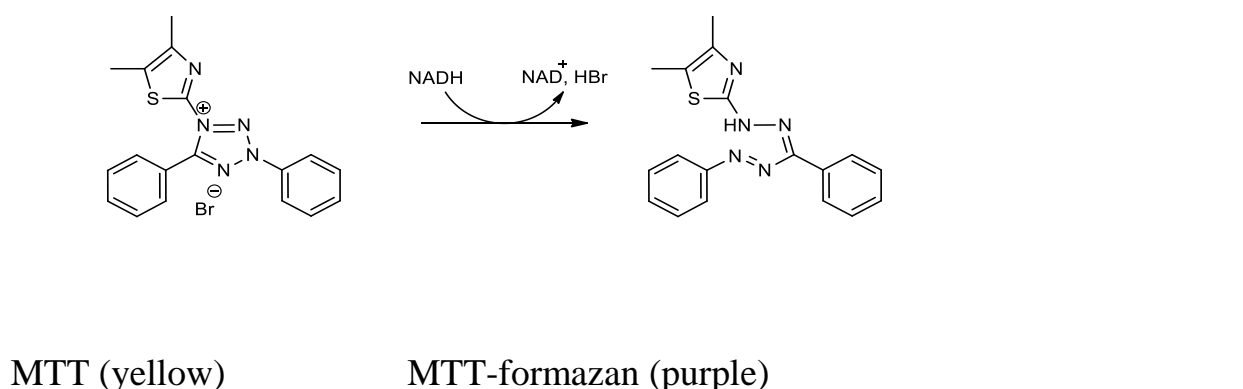


Figure 1 - MTT reduction reaction into MTT-formazan

During the experiment, after completing the required cultivation period, the culture medium in all wells is replaced with medium containing 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT reagent) at a concentration (0.45 mg/ml), The 96-well microplate is then incubated for 4 h at 37 °C (5% CO₂, humid atmosphere) until distinct formazan crystals form in control

cells, after which the medium is replaced with dimethyl sulfoxide to dissolve the formazan. The samples were shaken for 5 min, and the optical density of the samples was measured at 570 nm (control values at 620 nm) on a Multiscan FS spectrophotometer (ThermoFisher). Cell viability is calculated as the percentage of the sample absorbance value compared to the normalized absorbance value of the control without exposure to the compound.

The advantages of this method include: the possibility of simultaneously studying a large number of samples, low cost, ease of obtaining data, speed of the experiment, relatively high sensitivity and reproducibility.

Compared to fluorescent analysis, the sensitivity of the MTT test is lower, especially in the case of low metabolic activity of cells. And substances such as coenzyme A, vitamin A, polyphenols can prevent the reduction of MTT to formazan crystals. MTT itself, like formazan crystals, has a damaging effect on cells, changing their morphology [48].

1.6.2 Resazurin test

Resazurin is a redox dye that serves as an indicator of chemical cytotoxicity in cell culture [49].

The resazurin test is based on the ability of viable, metabolically active cells to reduce blue, non-fluorescent resazurin to pink, fluorescent resorufin, which can be determined colorimetrically or fluorimetrically. This process occurs with the participation of intracellular mitochondrial, microsomal and cytosolic oxidoreductases [51].

Resazurin is also included in various kits for determining cytotoxicity and cell viability, for example, AlamarBlue, PrestoBlue (Invitrogen), etc.

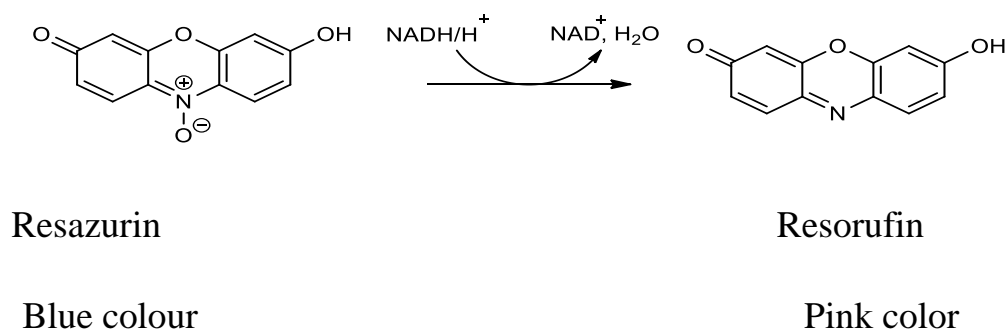


Figure 2 - The conversion reaction of resazurin to resorufin

Compared to the MTT test, resazurin is reduced by a wider range of enzymes: in addition to mitochondrial dehydrogenases, it is also reduced by cytochromes and dehydrogenases located in the cytoplasm of the cell. The advantages of the method include its accuracy and speed of measuring survival and cell proliferation [54].

1.6.3 Flow cytometry

A flow cytometer is a device that allows you to measure the optical properties of individual cells in suspension, the presence of the latter is necessary, since the measurement is performed in a liquid stream. The cytofluorimetric method of analysis is used in immunology, oncology, cytology, pharmacology, hematology, and plant growing. Analysis of the data obtained using this research method makes it possible to isolate populations of cells that have certain properties, as well as to determine their relative and absolute content in the sample.

In a simplified form, the operation of the flow system of the device proceeds as follows: a suspension of cells from a test tube with a sample is taken with a special needle (1); the cells are injected with a narrow jet into the center of the laminar flow of the sheath fluid, which is a buffer solution isotonic with respect to the cells (2); Taking a sample from a test tube and flowing liquid from the corresponding reservoir is carried out by supplying excess pressure (3); the fluid flow with the cells flows through the flow cell (4), where the optical properties of

the cells are measured; after passing through the flow cell, the liquid flow is collected in the drain (5).

The optical properties of the cell are measured in a flow cell, the key element of the cytofluorimeter, the design of which may differ in different models of cytometers.

Cells are centered in the flow cell by hydrodynamic focusing (strictly organized fluid flow). Therefore, it is necessary to maintain laminarity of the flow, i.e. moving the fluid in layers/jets without mixing them. The point is that the flow of cells in the center does not mix with the surrounding flowing fluid. Increasing the pressure of the flowing fluid increases the accuracy of the measurement.

The flow cytometer optical system consists of one or more monochromatic laser light sources and a signal detection system. When a cell passes a laser beam, part of the light is scattered by the cell; part of the light energy is absorbed and spent in heat, on the course of photochemical processes, or is emitted as light (fluoresces); part of the light passes unchanged, not interacting with the cell.

Simultaneous use of several dyes makes it possible to isolate cell populations with different combinations of the traits under study.

When choosing a dye, one should take into account that the wavelength of at least one of the laser sources must fall within the excitation spectrum of the dye and that the signal detection system must have at least one FL channel that allows receiving the dye fluorescence signal. When working with two or more dyes, the breadth and possibility of overlap between their fluorescence spectra must be taken into account. Otherwise, this can lead to misinterpretation of the results obtained. For modern flow cytofluorimeters, there are algorithms to compensate for the overlapping of fluorophore spectra.

In this work, we used the CytoFlex cytometer (Beckman Coulter, USA), shown in Figure 2.

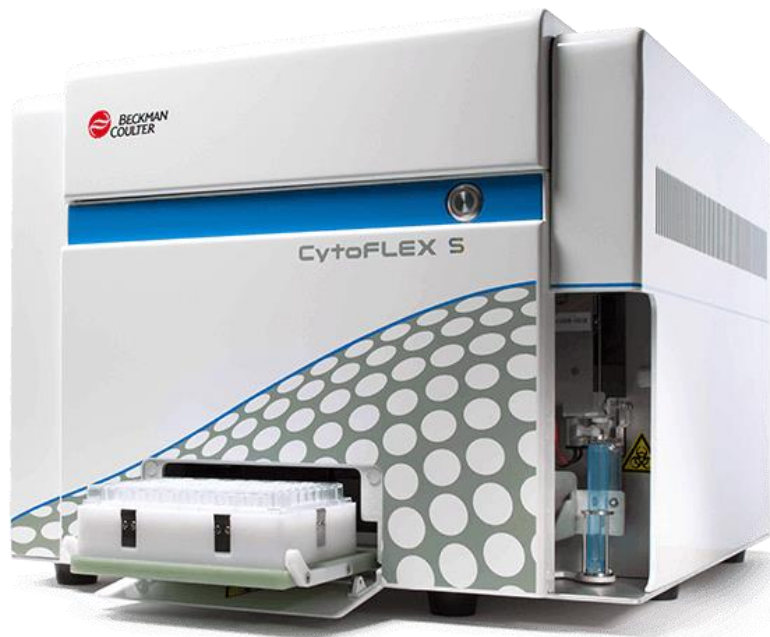


Figure 2 - CytoFlex cytometer (Beckman Coulter, USA)

The exceptionally high performance of these devices makes it possible to analyze large volumes of data containing information on tens and hundreds of thousands of cells.