

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ISSN 2305-2066

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION



СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ



ЦФА I

центр фармацевтической аналитики



GLP
сертификат



ISO
сертификат



**Основными видами деятельности
центра являются:**

- ✓ Биоаналитические исследования
- ✓ Тест кинетики растворения
- ✓ Разработка и валидация методик анализа

117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

www.cpha.ru

E-mail: info@cpha.ru

Тел.: +7 (499) 281-81-11

Серия тестеров растворения ERWEKA DT light

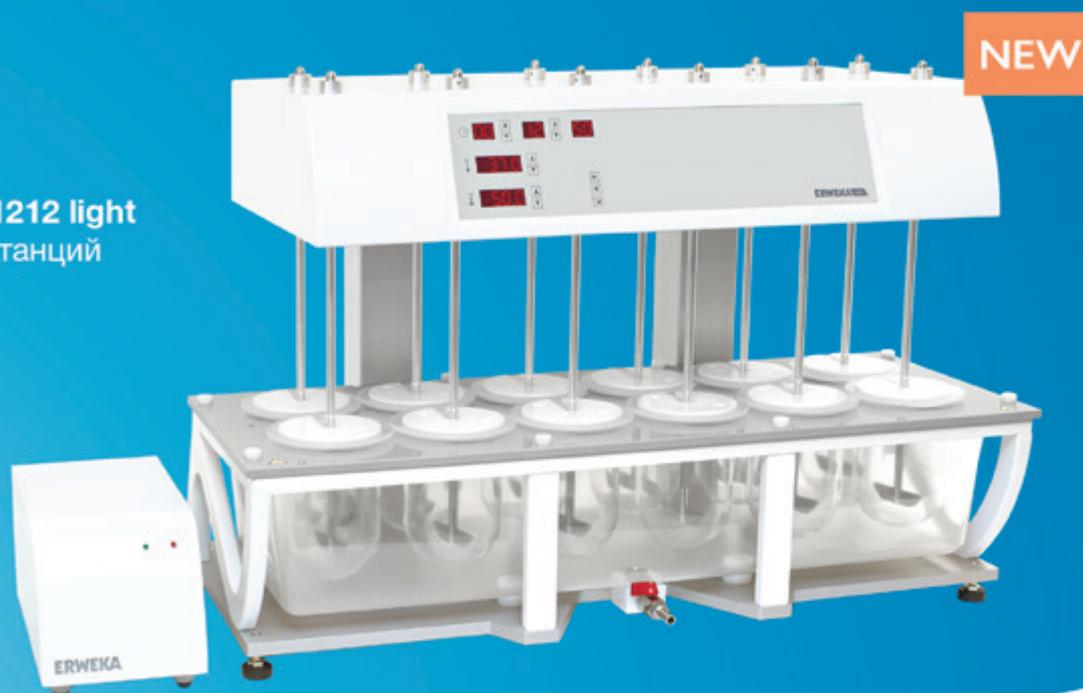
Экономичные тестеры с ручным отбором проб



DT 126 light
6 станций

DT 128 light
8 станций

DT 1212 light
12 станций



РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ISSN 2305-2066

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

**Учредитель**

ООО «Фармконтракт Медиа»
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский университет)
ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России

Директор журнала

Н. В. Кульджанова

Заведующий редакцией

Н. С. Михайлова

Редакционная коллегия**Главный редактор:**

И. Е. Шохин, д.фарм.н.

info@pharmjournal.ru**Редакторы**

Ю. И. Аммур, к.биол.н.
М. В. Белоусов, проф., д.фарм.н.
И. А. Василенко, проф., д.х.н.
Д. А. Гусаров, к.х.н.
Н. Б. Демина, проф., д.фарм.н.
С. В. Емшанова, д.фарм.н.
А. С. Князев, доц., д.х.н.
Ю. И. Кулинич, к.фарм.н.
О. Г. Макеев, проф., д.м.н.
Е. А. Малашенко, к.фарм.н.
Ю. В. Медведев, к.фарм.н.
Р. И. Мустафин, к.фарм.н.
Н. А. Оборотова, проф.,
д.фарм.н.
В. В. Попов, проф., д.м.н.

В. Л. Русинов, чл.-корр. РАН,
д.х.н.
Боян Салия (Сербия)
А. И. Сливкин, проф., д.фарм.н.
И. Е. Смехова, д.фарм.н.
В. В. Смирнов, к.фарм.н.
Поль Смит (Великобритания)
Я. М. Станишевский, проф.,
д.х.н.
Б. Б. Сысуев, доц., д.фарм.н.
В. Н. Ташлицкий, к.х.н.
В. Хуторянский, проф.
(Великобритания)
В. С. Чучалин, д.фарм.н.

Founder

Pharmcontract Media Ltd.
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
(Sechenov University)
Siberian State Medical University

Journal director

N. V. Kuldjanova

Managing Editor

N. S. Mikhaylova

Editorial board**Head Editor:**

I. E. Shohin, PhD

info@pharmjournal.ru**Editors**

Yu. I. Ammur, PhD
M. V. Belousov, prof., PhD
I. A. Vasilenko, prof., PhD
D. A. Gusarov, PhD
N. B. Diomina, prof., PhD
S. V. Emshanova, PhD
A. S. Knyazev, as.prof., PhD
J. I. Kulinich, PhD
O. G. Makeev, prof., PhD
E. A. Malashenko, PhD
Y. V. Medvedev, PhD
R. I. Moustafin, PhD
N. A. Oborotova, prof., PhD
V. V. Popov, prof., PhD

V. L. Rusinov, RAS c.-m., PhD
Bojan Calija, as.prof., PhD
(Serbia)
A. I. Slivkin, prof., PhD
I. E. Smekhova, PhD
V. V. Smirnov, PhD
Paul Smith (UK)
Ya. M. Stanishevskiy, prof., PhD
B. B. Sysuev, as.prof., PhD
V. N. Tashlitskiy, PhD
V. Khutoryanskiy, prof., PhD (UK)
V. S. Chuchalin, PhD

При поддержке
ФБУ «ГИЛС и НП»



Журнал был основан
в ноябре 2012 г. и выходит
периодичностью 4 раза в год

Адрес редакции

Россия, 115516, Москва,
ул. Промышленная, д. 11/3, оф. 419
+7 (495) 720 42 20
info@pharmjournal.ru
www.pharmjournal.ru

Отпечатано в типографии

ООО «Юнион Принт»
Россия, 603022, Н. Новгород,
ул. Окский съезд, 2

Ответственность за опубликован-
ные материалы несут авторы

Свидетельство о регистрации СМИ:

ПИ №ФС77-60744 от 11 февраля 2015 г.
выдано Федеральной службой по надзору
в сфере связи,
информационных технологий и массовых
коммуникаций

Журнал зарегистрирован в Российском
индексе научного цитирования (РИНЦ)
Тираж 2000 экземпляров

Журнал выходит один раз в квартал

Подписной индекс в каталоге

«Пресса России» 57964

Цена свободная

Media registration certificate:

ПИ №ФС77-60744, February 11, 2015,
given by Federal Service for Supervision
in the Sphere of Telecom, Information
Technologies and Mass Communications
(ROSKOMNADZOR)

Journal is registered in Russian index of
scientific citation

Circulation: 2000 copies

A peer-reviewed quarterly journal

Index listing

«The Russian Press» 57964

Free Price

Magazine was founded
in November 2012 and appears
4 times per year

Editorial office address

11/3, office 419, Promyshlennaya str.,
115516, Moscow, Russia
+7 (495) 720 42 20
info@pharmjournal.ru
www.pharmjournal.ru

Printing office

Union Print LLC
2, Okskiy s'ezd,
603022, N. Novgorod, Russia



Содержание

Contents

От редакции	5	Introduction
Мероприятия	6	Events
Раздел «Поиск и разработка новых лекарственных средств»		«Research and development of new drug products» part
<i>Е. В. Жохова, Я. А. Протасова, Г. П. Яковлев</i>	11	<i>E. V. Zhokhova, Y. A. Protasova, G. P. Yakovlev</i>
РАСТЕНИЯ РОДА ДРОК (<i>GENISTA</i> L.) – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ		PLANTS OF GENERA <i>GENISTA</i> L. AS PROMISING SOURCES OF PLANT RAW MATERIALS FOR THE CREATION OF NEW DRUG
<i>Т. И. Тарадейко, М. В. Сидорова, А. А. Иозен</i>	17	<i>T. I. Taradeyko, M. V. Sidorova, A. A. Iozep</i>
СИНТЕЗ КАРБОКСИЭТИЛАЛГИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ		SYNTHESIS OF CARBOXYETHYLALGINIC ACID AND ITS ETHYL ETHER
<i>Е. С. Кокарева, В. В. Морозов, Я. М. Станишевский, М. А. Журавлева, Н. В. Ноздрыухина, В. С. Орлова, Е. В. Орлова</i>	23	<i>E. S. Kokareva, V. V. Morozov, Ya. M. Stanishevskiy, M. A. Zhuravleva, N. V. Nozdryukhina, V. S. Orlova, E. V. Orlova</i>
АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СУБСТАНЦИЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА СЕЛЕКТИВНУЮ АКТИВАЦИЮ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЙ NO-СИНТАЗЫ (ОБЗОР)		ANALYSIS ON THE INFLUENCE OF VARIOUS SUBSTANCES ON SELECTIVE ACTIVATION OF Ca^{2+} -DEPENDENT NO-SYNTASE (REVIEW)
<i>Е. С. Кокарева, В. В. Морозов, Я. М. Станишевский, М. А. Журавлева, А. В. Зубков</i>	29	<i>E. S. Kokareva, V. V. Morozov, Ya. M. Stanishevskiy, M. A. Zhuravleva, A. V. Zubkov</i>
АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СУБСТАНЦИЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА АКТИВНОСТЬ КАСПАЗ (ОБЗОР)		RESEARCH ON THE INFLUENCE OF VARIOUS SUBSTANCES ON CASPASE ACTIVITY (REVIEW)
Раздел «Фармацевтическая технология»		«Pharmaceutical Technology» part
<i>Э. Ф. Степанова, С. О. Лосенкова, Ю. А. Морозов</i>	37	<i>E. F. Stepanova, S. O. Losenkova, Yu. A. Morozov</i>
СОЗДАНИЕ И ФАРМАКОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ МЕКСИДОЛА		CREATION AND PHARMACOTECHNOLOGICAL INVESTIGATIONS OF INNOVATIVE DOSAGE FORMS OF MEXIDOL
<i>Е. К. Новикова, Д. А. Чачин, И. Е. Каухова, С. А. Минина</i>	44	<i>E. K. Novikova, D. A. Chachin, I. E. Kaukhova, S. A. Minina</i>
РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ГРАНУЛ В ТВЁРДЫХ ЖЕЛАТИНОВЫХ КАПСУЛАХ НА ОСНОВЕ КОМПОЗИЦИИ СУХИХ ЭКСТРАКТОВ ЧЕРЕДЫ ТРЕХРАЗДЕЛЬНОЙ ТРАВЫ, ЗОЛОТАРНИКА КАНАДСКОГО ТРАВЫ, РЕПЕШКА ОБЫКНОВЕННОГО ТРАВЫ		DEVELOPMENT AND STANDARDIZATION OF GRANULES IN HARD GELATIN CAPSULES BASED ON THE COMPOSITION OF DRY EXTRACTS OF <i>BIDENS TRIPARTITA</i> , <i>SOLIDAGO CANADENSIS</i> L. AND <i>AGRIMONIA EUPATORIA</i> HERBS
<i>Н. А. Ляпунов, Е. П. Безуглая, В. А. Бовтенко, Столпер, Ю. М. В. Н. Баумер, Е. Ю. Брылёва</i>	49	<i>N. A. Lyapunov, E. P. Bezuglaya, V. A. Bovtenko, Yu. M. Stolper, V. N. Baumer, K. Yu. Bryleva</i>
УПРАВЛЕНИЕ РИСКАМИ ДЛЯ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ САЛЬБУТАМОЛА В ФОРМЕ ДОЗИРОВАННЫХ АЭРОЗОЛЕЙ		QUALITY RISK MANAGEMENT FOR SALBUTAMOL PRESSURIZED METERED DOSE INHALERS
<i>И. Е. Смахова, В. А. Вайнштейн, Ю. М. Ладутько, О. В. Дружининская, Н. Н. Турецкова</i>	62	<i>I. E. Smekhova, V. A. Vainshtein, Y. M. Ladutko, O. V. Druzhininskaya, N. N. Tureckova</i>
ДЕЗИНТЕГРАНТЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РАСТВОРЕНИЕ СУБСТАНЦИЙ РАЗНЫХ КЛАССОВ ПО БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КЛАССИФИКАЦИОННОЙ СИСТЕМЕ		DISINTEGRANTS AND THEIR INFLUENCE ON THE DISSOLUTION OF SUBSTANCES OF BIOPHARMACEUTICAL CLASSIFICATION SYSTEM CLASSES
<i>Ю. М. Домнина, С. А. Кедик, В. В. Суслов, Е. А. Шняк</i>	73	<i>Y. M. Domnina, S. A. Kedik, V. V. Suslov, E. A. Shnyak</i>
ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ НАЗАЛЬНОГО СПРЕЯ НАЛТРЕКСОНА ГИДРОХЛОРИДА		RATIONALE FOR THE SELECTION OF AUXILIARY COMPONENTS FOR THE NALTREXONE HYDROCHLORIDE NASAL SPRAY
Раздел «Методы анализа лекарственных средств»		«Analytical Methods» part
<i>А. М. Кутовая, И. А. Мартынич, Т. Е. Трумпе, Е. В. Ферубко, В. Н. Давыдова</i>	78	<i>A. M. Kutovaya, I. A. Martinchik, T. E. Trumpe, E. V. Ferubko, V. N. Davydova</i>
РАЗРАБОТКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО СБОРА ИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ		DEVELOPMENT AND EXPERIMENTAL STUDY OF HYPOGLYCEMIC COMPOSITION PREPARED FROM MEDICINAL PLANTS



Н. В. Скляревская, З. Р. Дитковская, Ю. А. Гладкая, Г. П. Яковлев
МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЛИСТЬЕВ
НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЛАБАЗНИКОВ

82 N. V. Sklyarevskaya, Z. R. Ditkovskaya, Yu. A. Gladkaya, G. P. Yakovlev
MORPHOLOGICAL AND ANATOMIC SIGNS OF LEAVES OF SOME
SPECIES OF MEADOWSWEET

Раздел «Доклинические и клинические исследования»

«Preclinical and clinical study» part

Е. А. Ситникова, С. Г. Марданлы, Е. П. Рогожникова
РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНОГО ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ
БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИБУПРОФЕНА

86 E. A. Sitnikova, S. G. Mardanly, E. P. Rogozhnikova
RESULTS OF PRECLINICAL SAFETY TESTING COMPARISON FOR
IBUPROFEN DRUG PRODUCTS

И. Н. Уракова, О. Н. Пожарицкая, В. Ю. Сухов, М. Н. Макарова,
А. Н. Шиков, В. Г. Макаров
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЧЕНОГО ЙОДОМ-123
ПЕПТИДНО-БЕЛКОВОГО ПРЕПАРАТА ЦЕЛЛЕКС У КРЫС

89 I. N. Urakova, O. N. Pozharitskaya, V. J. Sukhov, M. N. Makarova,
A. N. Shikov, V. G. Makarov
DISTRIBUTION OF THE LABELED [¹²³I] PEPTIDE-PROTEIN DRUG
CELLEX IN RATS

Раздел «Регуляторные вопросы»

«Regulatory Issues» part

А. А. Крылатова, И. Е. Шохин, А. С. Кардашин
ОПЫТ ВНЕДРЕНИЯ СИСТЕМЫ LIMS В БИОАНАЛИТИЧЕСКИЙ
ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР
(ЧАСТЬ 1)

95 A. A. Krylatova, I. E. Shohin, A. S. Kardashin
AN EXPERIENCE OF IMPLEMENTING LIMS SYSTEM
IN THE BIOANALYTICAL LABORATORY
(PART 1)

К. С. Мильчаков
РОЛЬ ОБЗОРА НАУЧНЫХ РАБОТ В РЕГИСТРАЦИИ
ВОСПРОИЗВЕДЕННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА
НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И ЗОНЕ ЕАЭС

99 K. S. Milchakov
THE ROLE OF THE SCIENTIFIC OVERVIEWS IN THE GENERIC DRUG
REGISTRATION PROCESS IN THE RUSSIAN FEDERATION
AND EURASIAN ECONOMIC UNION

Публикации партнеров

106 Partner Publications

III-я НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

«РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В СООТВЕТСТВИИ С ПРИНЦИПАМИ НАДЛЕЖАЩИХ ПРАКТИК GxP»

6 декабря 2018 г. 10.30-16.00,
Москва, АО «Технопарк Слава» (Научный проезд, д. 20, стр.2)

Организатор:

GLP-сертифицированный лабораторный центр
ООО «Центр Фармацевтической Аналитики»



Информационная поддержка:



Регистрация участников с 10:30 до 11:00.

Научная программа конференции включает в себя выступления ведущих специалистов по темам:

- интеграция LIMS в практическую деятельность фармацевтической лаборатории;
- исследования иммуногенности препаратов-биоаналогов по требованиям FDA и ЕАЭС;
- опыт сертификации лабораторного центра по требованиям ISO 9001-2015;
- комментарии к Руководству ЕАЭС по исследованиям биоэквивалентности.

Лекторы семинара: кандидаты и доктора наук, сотрудники научных учреждений и ВУЗов, лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, в том числе:

- Игорь Шохин, д.фарм.н. (ООО «ЦФА»)
- Дмитрий Рождественский, к.м.н. (Евразийская экономическая комиссия)
- Евгений Мельников, к.фарм.н. (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)
- Александр Кардашин (Labware)

Для участия в конференции необходимо выслать заявку на адрес info@pharmjournal.ru до 5 декабря.

Участие бесплатное! Количество мест ограничено (не более 150 слушателей)!

Контакты: офисный тел. +7 (499) 281-81-11
(секретарь оргкомитета – Надежда)
e-mail: info@pharmjournal.ru

Обращение главного редактора Глубокоуважаемые читатели!

Вы держите очередной номер научно-производственного рецензируемого журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». Мы спешим сообщить Вам, что, несмотря на смену собственника издания и перерегистрацию, журнал будет продолжать издаваться на ежеквартальной основе и размещаться в бесплатном открытом доступе на сайте pharmjournal.ru и библиотеке Elibrary. Журнал сохранил свои позиции в Перечне рецензируемых научных журналов, включённых Высшей аттестационной комиссией России в список изданий, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата и доктора наук (перечень от 09.08.2018 г.).

Разделы журнала по-прежнему охватывают весь жизненный цикл лекарственного средства. Первый раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств, второй – фармацевтической технологии и рассматривает научные и практические направления от разработки и производства исходных фармацевтических ингредиентов, технологий и оборудования – до создания стандартных и терапевтически эффективных лекарственных препаратов. Третий раздел описывает аналитические методики контроля качества; четвертый раздел посвящен подходам к оценке эффективности и безопасности лекарственных средства, проведению доклинических и клинических исследований; в пятом разделе рассматриваются вопросы валидации методик, подготовки регистрационного досье, жизненный цикл лекарственного препарата в GxP-окружении.

В ближайшее время у редакции журнала большие планы – пересмотр и расширение состава редакционной коллегии с целью включения в её состав ведущих отечественных и зарубежных исследователей в области фармацевтических наук. Рецензирование статей планируется сделать «слепым двусторонним», кроме того, каждую работу могут рассматривать два рецензента. Далее мы планируем переделать к следующе-



Шохин Игорь Евгеньевич

му выпуску сайт издания таким образом, чтобы он полностью соответствовал всем требованиям международных баз данных. Дорожная карта развития журнала подразумевает, что к концу 2019 года мы подадим заявку на включение издания в базу данных Scopus (Elsevier). Авторы журнала в связи с этим должны быть готовы к тому, что такие задачи приведут к изменениям в требованиях к оформлению статей и возможно сделают их более строгими и стандартизованными. Однако рассчитываем на то, что нашими общими усилиями мы сможем поднять уровень публикаций, развить журнал и выйти на международный уровень, что особенно актуально в рамках действующей программы 5–100 по повышению престижности российского высшего образования.

*С уважением, главный редактор, д.фарм.н.
Шохин Игорь Евгеньевич*

ИТОГИ СЕМИНАРА ПО ВОПРОСАМ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ

3 и 4 сентября в г. Москве и г. Пущино (Московская область), на базе лаборатории биологических испытаний ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ФИБХ РАН), прошел семинар с международным участием, организованный Федеральной службой по аккредитации (Росаккредитацией). Росаккредитация является федеральным органом исполнительной власти, осуществляющим функции национального органа Российской Федерации по аккредитации, и находится в ведении Министерства экономического развития Российской Федерации. Сферу деятельности Росаккредитации составляют: формирование единой национальной системы аккредитации и осуществление контроля деятельности аккредитованных лиц.



Семинар по вопросам надлежащей лабораторной практики был проведен в рамках проекта Россия – Организация экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) «Техническое содействие по вопросам совершенствования российской системы надлежащей лабораторной практики (НЛП)». Для участия в мероприятии были приглашены консультанты ОЭСР **Дэвид Лонг** (Франция) и **Тео Хелдер** (Нидерланды), представители Евразийской экономической комиссии (ЕЭК), национальных органов по аккредитации стран-членов Евразийского экономического союза (ЕАЭС) – Беларуси, Казахстана, Кыргызстана.

Дэвид Лонг является организатором курсов по вопросам GLP, в прошлом руководитель обучающих курсов для GLP инспекторов Французского агентства медицины. От имени Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) провёл значительное число международных семинаров в Африке (Гана, ЮАР), Латинской Америке (Колумбия, Бразилия), Азии (Таиланд, Индия), а также несколько раз в Женеве. Разработал программу «К GLP шаг за шагом» (Step-wise Implementation of GLP) – проект, позволяющий испытательным центрам

осуществить последовательное получение GLP-статуса в определённый период времени. Он был впоследствии включен в Руководство ВОЗ по вопросам GLP (WHO Handbook on GLP). Принимал участие в разработке ряда консультативных документов ОЭСР по линии обеспечения качества, по вопросам проведения многоцентровых и краткосрочных исследований, компьютерной валидации. Выступал в качестве докладчика при согласовании документа ОЭСР о краткосрочных исследованиях. Регулярно участвует в выездных оценках национальных программ по организации GLP-мониторинга. С 2001–2007 гг. возглавлял структурное подразделение L'OREALGROUP, отвечающее за организацию менеджмента качества косметики и фармацевтической продукции. С 2007 года возглавляет собственную консалтинговую фирму, которая оказывает услуги по сопровождению инспекционных проверок.

Тео Хелдер посвятил более 10 лет работе в области токсикологии и патологии. В прошлом имел опыт работы в органе мониторинга соответствия принципам GLP Министерства здравоохранения Ни-



Дэвид Лонг

дерландов, который впоследствии возглавил. В течение 19 лет являлся членом рабочей группы ОЭСР по вопросам GLP, которую возглавлял с 1996–1998 гг. Участвовал в разработке ряда консультативных документов ОЭСР, в частности, документа о проведении полевых исследований, возглавлял работу по принятию документов о компьютеризированных системах, о задачах и обязанностях спонсора, об архивировании данных. Принимал активное участие в организации и проведении ряда обучающих мероприятий ОЭСР в сфере GLP. Представлял Нидерланды в рабочей группе Евросоюза по вопросам GLP, участвовал в утверждении национальных программ по организации GLP-мониторинга в Румынии и Таиланде. Является основателем собственной консалтинговой фирмы, занимающейся консультированием организаций по вопросам реализации принципов GLP.

Первый день семинара был организован в здании Министерства экономического развития Российской



Тео Хелдер

Федерации. Открытие началось с вступительных слов руководителя Росаккредитации **Херсонцева Алексея Игоревича**, заместителя Министра экономического развития **Шипова Саввы Витальевича** и заместителя руководителя Росаккредитации **Литвака Александра Геннадьевича**. В рамках круглого стола были рассмотрены вопросы, касающиеся задач и обязанностей органов мониторинга и органов регулирования, процедуры мониторинга соответствия принципам НЛП, сравнение принципов надлежащей лабораторной практики и требований стандарта ИСО/МЭК 17025, введение в принципы НЛП, основные элементы исследования – 6 последовательных этапов: планирование, выполнение, осуществление записей, формирование отчета, архивирование и мониторинг. Также были рассмотрены вопросы о порядке проведения инспекций испытательных центров (лабораторий), аудите исследований, характеристиках инспектора, порядке составления отчета по проведению инспектирования испытательных центров (лабораторий) и задачах подразделений по обеспечению качества. Обсуждался порядок архивирования: требования и пути решения (электронное архивирование); архивация, как способ «реконструкции» исследования аудитором.

Докладчиками было отмечено, что основная цель НЛП – помочь ученым получить данные, которые являются надежными, воспроизводимыми, проверяемыми, признанными во всем мире учеными и регуляторными органами.

Второй день семинара проходил на базе лаборатории биологических испытаний ФГБУН «Института биологической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук» (ФИБХ РАН). Лаборатория биологических испытаний с 2005 года имеет аккредитацию Международной ассоциации по оценке и аккредитации работы с лабораторными животными (AAALAC). В 2013 году лаборатория получила официальное международное признание соответствия принципам надлежащей лабораторной практики (GLP) Словацкой национальной службой по аккредитации (SNAS), а в 2014 году лаборатория первой получила признание соответствия принципам GLP Росаккредитацией. Наличие AAALAC аккредитации и международного признания соответствия принципам GLP ОЭСР позволяет лаборатории осуществлять экспорт такой высокотехнологической услуги, как выполнение доклинических исследований.

Перед посещением лаборатории **Тео Хелдер** выступил с докладами, посвященными спонсорам исследований (пояснялись основные обязанности в рамках ведения проекта); объектам испытаний и поставщикам; краткосрочным исследованиям (в качестве примеров были приведены исследования описания свойств веществ, температуры плавления, коэффициента распределения, взрывчатых свойств и др.) и компьютеризированным системам (пояснялись требования к валидации, оценке качества и документации). Также с докладами выступили доктор биологических наук, профессор **Мурашев Аркадий Николаевич** и кандидат биологических наук **Дьяченко Игорь Александрович**.

НОВАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА В ОБЛАСТИ ФАРМАЦЕВТИКИ И БИОТЕХНОЛОГИЙ – PHARMA'S COOL

Завершилась пятая образовательная программа Кластера биологических и медицинских технологий Фонда «Сколково» и Открытого университета Сколково (ОтУС) Pharma's cool. В рамках двух модулей 22-24 октября и 12-13 ноября эксперты Фонда «Сколково», а также приглашенные специалисты делились опытом в области разработки и вывода на рынок лекарственных препаратов. В мероприятии участвовали студенты, молодые ученые и представители стартапов.



Кластер биомедицинских технологий Фонда «Сколково» и Открытый университет Сколково (ОтУС) провели ежегодную образовательную программу Pharma's cool – 2018. В рамках двух модулей в октябре и ноябре эксперты Фонда «Сколково», а также приглашенные специалисты делились опытом в области разработки и вывода на рынок лекарственных препаратов. В мероприятии участвовали студенты, молодые ученые и представители стартапов.

Спикерами программы выступили специалисты глобальных фармацевтических корпораций, венчурных фондов и успешных стартапов. В том числе представители компаний «АстраЗенека», ИФАРМА, Chiesi, «Р-Фарм», RegemConsultingLtd, МБЦ «Генериум» и других.

Программа Pharma's cool проходит ежегодно, начиная с 2014 года, и каждый раз собирает более 1000 участников. Программа включает серию лекций и мастер-классов от ведущих экспертов отрасли, обзор рынка фармацевтики и трендов, вызывающих взрыв-

ной рост отдельных направлений биотеха, охватывает вопросы от идентификации таргета в научной лаборатории до акселерации биотехнологических стартапов. Ключевыми спикерами этого года стали профессионалы рынка из компаний AstraZeneca, Pharmstandard Ventures, 4Bio Capital Partners, Generium и других.

В ходе обучения представители ведущих фармацевтических компаний делятся своими знаниями в области разработки лекарств, что представляет интерес как для студентов и аспирантов медицинских, биологических, химических специальностей, так и для состоявшихся сотрудников фармацевтических компаний.

В 2018 году программа состояла из двух модулей интенсивного обучения, которые покрывают весь жизненный цикл продукта.

Первый модуль посвящен выстраиванию базы предметных знаний по разработке новых лекарственных средств, где также затрагиваются самые актуальные темы в области фармацевтики: текущее состояние

рынка биотехнологических и клеточных препаратов, особенности клинических исследований онкологических и орфанных препаратов.

В ходе своего выступления представители компании Genegium рассказали собравшимся о текущем состоянии рынка биотехнологий и перспективах развития: «По оценкам экспертов глобальный рынок биотехнологических препаратов в 2017 году составил 221 млрд \$, это моноклональные антитела, терапевтические белки, вакцины. На сегодняшний день наиболее активная область для разработки биотехнологических препаратов – это онкология. В 2017 году на мировом рынке биопрепаратов доля моноклональных антител составила 43% и 100 млрд \$ в денежном выражении, доля терапевтических белков – 80 млрд \$ или 36% мирового рынка биопрепаратов, из них гормоны составляют 45% рынка, цитокины – 18%, ферменты 10%, факторы свертываемости крови – 27%. Доля вакцин на мировом рынке составляет порядка 21%. Ожидается, что к 2025 году глобальный рынок биотехнологий превысит 0,5 трлн \$ (по оценке Grand View Research – 727,1 млрд \$). «Горячей» областью фармакологии является иммуноонкология. CAR-T стали еще одним успешным иммуноонкологическим подходом наряду с ингибиторами иммунного checkpoints и биспецифическими (T-engaging) антителами, который на сегодняшний день активно развивается».

Во втором модуле речь шла о бизнес-составляющей работы в отрасли: о том, как создать свою компанию, где найти инвестиции под собственный проект в области биотеха, как защитить интеллектуальные права на результаты исследования. Представители вен-



чурных фондов рассказали о требованиях к идеям и стартапам в биотехе, правилах подготовки материалов для инвесторов, финансовом моделировании и структурировании сделок.

Представители венчурных фондов поделились с собравшимися информацией о том, какие на сегодняшний день существуют наиболее привлекательные направления для инвестирования, каким образом выбирать инвесторов, о требованиях со стороны инвестора к идеям и стартапам в биотехе, а также рассказали об особенностях привлечения финансирования на разных этапах жизненного цикла проекта. Были также рассмотрены форматы коммерциализации научных разработок, ценнообразование в области лекарственных средств, механизмы патентной и регуляторной защиты новых лекарственных препаратов, риск-менеджмент в области биотехнологий.

Ключевыми факторами успеха проекта по мнению экспертов фонда Skolkovo Ventures являются:





- Сильная команда проекта, обладающая экспертизой в вопросах, связанных с представленной разработкой.
- Наличие в команде лидера, имеющего компетенции в сфере бизнеса и умеющего мотивировать команду.
- Среди команды проекта должны быть специалисты как научного круга, так и с бизнес-компетенциями.
- Команды, состоящие из представителей только науки или только бизнеса, как правило, неуспешны.

Елена Старикова, представитель фонда Pharm-standard Ventures, рассказала о наиболее приоритетных для их фонда направлениях для инвестирования:

- Онкология.
- Воспалительные заболевания.
- Офтальмология.
- Аутоиммунные заболевания.

- Заболевания обмена веществ.
- Клеточная терапия.
- Генная терапия.

«Наиболее привлекательными для инвестирования с точки зрения соотношения риск-выгода являются проекты с подтвержденной эффективностью препарата на животных моделях. Если мы говорим о противоопухолевых препаратах, то основным показателем эффективности является снижение размеров опухоли, связанное с применением препарата».

В этом году Pharma's cool – 2018 посетило более 1000 человек, 352 из которых получили сертификаты участников по итогам прохождения тестирования.

Камила Зарубина, директор по акселерации биомедицинского кластера **Фонда «Сколково»**: «Площадка Pharma'scool – это уникальная возможность для молодых учёных и представителей стартапов расширить свои знания в области разработки и вывода на рынок лекарственных препаратов. Мы счастливы, что программа проходит уже пятый год и с каждым годом количество участников только растёт. Думаю, это связано с тем, что в каждую новую программу мы привлекаем новых экспертов, партнеров, меняем формат и придумываем какие-то интересные интерактивы для наших участников. Для Фонда «Сколково» важно проводить подобные образовательные программы, для нас это как инструмент поиска перспективных технологий и проектных команд, а также развитие плодотворного сотрудничества с фармацевтической отраслью. В начале года Фонд «Сколково» запустил несколько акселерационных программ с фармацевтической индустрией, связанных с работой со стартапами».



УДК 615.1; 615.2; 615.4

РАСТЕНИЯ РОДА ДРОК (*GENISTA* L.) – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Е. В. Жохова^{1*}, Я. А. Протасова¹, Г. П. Яковлев¹

Резюме. В обзоре приведено географическое распространение, ботаническое описание, химический состав, сведения об использовании в медицине и исследовании фармакологической активности представителей рода *Genista* L. – дроков. Показано, что растения рода широко распространены на территории Российской Федерации, однако провести систематизацию растений рассматриваемого рода на основе морфологических признаков, достаточно затруднительно, так как они имеют обширный ареал обитания и, соответственно, морфологические признаки у одного вида очень сильно варьируют в пределах ареала. Растения рода имеют богатый состав биологически активных веществ. В то же время анализ литературных данных о продуктах вторичного метаболизма видов рода *Genista* выявил неравномерную степень их изученности. Настои и отвары из травы дрока красильного издавна используются в народной медицине, как диуретическое, желчегонное и слабительное средство, а анализ литературных источников показал, что растения рода перспективны при различных патологиях. Авторами обзора показана необходимость комплексного морфолого-анатомического, фитохимического и молекулярно-генетического исследования растений рода дроков для уточнения систематики и введения в медицинскую практику.

Ключевые слова: *Genista*, молекулярно-генетический анализ, фитохимический анализ, алкалоиды хинолизидинового ряда, изофлавоноиды, биологическая активность.

PLANTS OF GENERA *GENISTA* L. AS PROMISING SOURCES OF PLANT RAW MATERIALS FOR THE CREATION OF NEW DRUGE. V. Zhokhova^{1*}, Y. A. Protasova¹, G. P. Yakovlev¹

Abstract. The review presents the geographical distribution, botanical description, chemical composition, information about the use in medicine and the study of the pharmacological activity of the representatives of the genus *Genista* L. It is shown that the plants of the genus are widely distributed on the territory of the Russian Federation, however, it is rather difficult to systematize the plants of the genus of interest on the basis of morphological characters, since they have an extensive habitat and, accordingly, the morphological characteristics of one species vary greatly within the range. Plants of the genus have a rich composition of biologically active substances. At the same time, an analysis of literature data on products of the secondary metabolism of species of the genus *Genista* revealed an uneven degree of their knowledge. Infusions and decoctions from the grass of *Genista* are used in folk medicine as a diuretic, choleric and laxative, and an analysis of literary sources showed that plants of the genus are promising in various pathologies. The authors of the review showed the need for a complex morphological, anatomical, phytochemical, and molecular genetic study of plants of the genus *Genista* to clarify the taxonomy and introduction into medical practice.

Keywords: *Genista*, molecular-genetic analysis, phytochemical analysis, alkaloids, flavonoids, biological activity.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., Saint-Petersbourg, 197376, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: elena.zhokhova@pharmnotech.com

Тел.: 8 (812) 499 39 00, доб. 42-40

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные растения занимают важное место в фармацевтической практике. В общей номенклатуре лекарственных средств приблизительно 40% составляют препараты растительного происхождения. По сравнению с синтетическими, растительные препараты, наряду с мягким многосторонним действием характеризуются, как правило, почти полным отсутствием нежелательных побочных эффектов. Изучение и внедрение в научную медицину новых растительных объектов стали одними из самых актуальных задач современной фармакогнозии. Одним из перспективных источников расширения базы лекарственных растений являются представители рода дроков.

Род дроков (*Genista* L.) относится к семейству бобовые (Fabaceae), подсемейству мотыльковые (Faboideae) [2] и насчитывает около 100 видов, которые встречаются в Европе (преимущественно в странах Средиземноморья), на Канарских островах, в Передней Азии, северной части Африки, вид *G. tinctoria* натурализован в Северной Америке [23].

В России виды рода *Genista* L. встречаются в европейской части, на Кавказе и в Западной Сибири. Согласно данным, полученным из литературных источников и гербария Европейской части России БИН им. В. Л. Комарова РАН, наиболее широко на территории Российской Федерации распространён дрок красильный (*G. tinctoria* L.). Вторым по распространён-

ности является дрок германский (*G. germanica* L.). Как дрок красильный, так и дрок германский произрастают в лесах, лугах, степях в местах с повышенной влажностью, таких как склоны и дно оврагов или на вторых террасах долин рек. Основное количество видов рода дроков произрастает на территории южных субъектов Российской Федерации: Крымском полуострове, Ставропольском крае, Краснодарском крае, Карачаево-Черкесии, Адыгеи, предпочитая южные сухие каменистые склоны гор. Растения рода не выносят переувлажнения и сильных морозов. Очень светолюбивы и засухоустойчивы. Представляют собой преимущественно кустарники и кустарнички, с колючками, находящимися в пазухах листьев, или без них. Листья считаются однолисточковыми, голые или опушенные; соцветия кистевидные, цветки с венчиком мотылькового типа, желтого или беловато-желтого цвета, плод боб голый или опушенный, яйцевидный или линейный, дву-многосемянной.

Согласно данным «Флоры СССР» (август 1941 года) на территории России и сопредельных государств распространены 20 видов рода *Genista*: подрод *Spartocarpus*: *G. germanica*; подрод *Stenocarpus*: *G. albida*, *G. compacta*, *G. scythica*, *G. angustifolia*, *G. armeniaca*, *G. depressa*, *G. flagellaris*, *G. lipskii*, *G. humifusa*, *G. tetragona*, *G. glaberrima*, *G. mingrelica*, *G. artwinensis*, *G. tinctoria*, *G. tanaïtica*, *G. transcaucasica*, *G. patula*, *G. suanica*, *G. pilosa* [3]. В перечне С. К. Черепанова (1995 год) указаны 12 видов: *G. abchasica*, *G. dracunculoides*, *G. godetii*, *G. juzepczukii*, *G. kolakowskyi*, *G. millii*, *G. ovata*, *G. rupestris*, *G. sibirica*, *G. taurica*, *G. vera*, *G. tinctoria* [8]. В соответствии с Всемирной базой данных – International Legume Database & Information Service (ILDIS) (2016 год) на территории России представлены 18 видов: *G. abchasica*, *G. albida*, *G. angustifolia*, *G. armeniaca*, *G. compacta*, *G. depressa*, *G. flagellaris*, *G. germanica*, *G. humifusa*, *G. juzepczukii*, *G. kolakowskyi*, *G. millii*, *G. mingrelica*, *G. pilosa*, *G. scythica*, *G. tetragona*, *G. tinctoria*, *G. transcaucasica*.

Во всех трех источниках для систематизации рода *Genista* L. используются макроскопические признаки, такие как: форма и размеры листьев, их расположение; строение и размеры цветков, и каким образом они собраны в соцветие; характер опушения листьев, цветков, плодов, завязи; строение и размеры плода, количество семян в нём [3, 8].

Как видно из приведенных данных, провести систематизацию растений рассматриваемого рода на основе морфологических признаков, достаточно затруднительно, так как дроки имеют обширный ареал обитания и, соответственно, морфологические признаки у одного вида очень сильно варьируют в пределах ареала.

Сравнительное изучение микроскопических признаков видов рода не проводилось, имеются литературные данные о микроскопических исследованиях под электронным микроскопом в 2010 году R. Longo с соавторами пыльцевых зерен восточных видов рас-

тений рода *Genista* подрода *Spartocarpus*. В результате которых было установлено, что пыльцевые зерна у всех исследованных видов одиночные, изополярные, радиально симметричные, разделенные тремя диффузными бороздами, маленького размера, сферические, с перфорированными перемычками и микросетчатой экзиной. А также отмечено, что у некоторых видов пыльцевые зерна имели небольшие различия по форме и размеру, а также по строению экзины [28].

Следует отметить, что до настоящего времени молекулярно-генетический метод систематики для уточнения системы рода *Genista* L. на территории России не использовался. В то же время исследования на основе данных молекулярно-генетического анализа для установления филогении рода широко применяются зарубежными учеными. Так, С. Pardo с соавторами (2004) исследовали филогенетические связи между видами рода дроков, произрастающими на территории Испании, и другими близкородственными видами. В качестве молекулярно-генетического маркера использовали фрагмент ITS ядерной ДНК и фрагмент trnL-trnF хлоропластной ДНК. В результате род *Genista* был разделен на три подрода *Phyllobotrys*, *Spartocarpus* и *Genista* (таблица 1) [24].

С различной степенью детализации изучался компонентный состав у разных видов рода. Сравнительно подробно исследован состав биологически активных соединений таких отечественных видов, как *G. germanica*, *G. patula*, *G. pilosa*, *G. tinctoria*, *G. transcaucasica*. Во всех изученных видах обнаружены фенольные соединения и алкалоиды [7].

Из фенольных соединений в видах рода *Genista* обнаружены фенольные кислоты, флавоноиды, дубильные вещества. Состав фенольных кислот изучался только для *G. tinctoria*, в ходе исследований были идентифицированы хлорогеновая, п-кумаровая, кофейная и феруловая кислоты [18]. Во всех изученных видах обнаружены флавоноиды (таблица 2).

Имеются сведения о содержании дубильных веществ у *G. tinctoria* и *G. transcaucasica*. Однако подробного изучения качественного состава дубильных веществ не проводилось [7].

В видах рода обнаружены алкалоиды (таблица 3).

Наиболее детально изучен состав, а также динамика накопления алкалоидов для *G. tinctoria*. Установлено, что по количественному содержанию основными алкалоидами *G. tinctoria* являются цитизин, анагирин, лупанин, баптифолин, N-метилцитизин. Максимальное содержание (0,22%) отмечено для баптифолина, который обнаруживается только в периоды цветения и плодоношения в основном в ветвях. Цитизин, анагирин и N-метилцитизин идентифицируются во все фазы вегетации, однако максимальное их содержание (до 0,2%) наблюдается в ветвях в фазу цветения. Другой хинолизидиновый алкалоид, лупанин, выявляется только в ветвях во время образования почек и в цветках и листьях в период цветения (0,03%) [31].

Таблица 1.

Условия амплификации

Реактивы и оборудование	Использованные праймеры		Программа амплификации	Источник литературы	
	ITS 1	ITS 5			
Реактивы: выделение ДНК: DNeasyPlantsminiKits (Qiagen, Франция) очистка ДНК: ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) Оборудование: ABI PRISM 377 DNA Sequencer Состав 50 мкл образца: 50 нг ДНК 2 ммоль MgCl ₂ 200 мкмоль оснований 0,5 мкМ каждого праймера 1 У ДНК-полимеразы (Biotoools)	для фрагмента ITS			14, 30, 33	
	ITS 1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG	5 мин 94 °C далее 35 циклов, включающих 30 с 94 °C 30 с 54 °C 2 мин 72 °C, затем 5 мин 72 °C		
	ITS 5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG			
	ITS 4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC			
	для фрагмента trnL-trnF				5 мин 94 °C далее 35 циклов, включающих 1 мин 94 °C 1 мин 48 °C 2 мин 72 °C, затем 5 мин 72 °C
	e	5'-GGTTC AAGTCCCTCTATCCC			
f	5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG				

Таблица 2.

Флавоноиды, содержащиеся в растениях рода *дрок*

Название флавоноида и его биологическая активность	Химическая формула	Источник литературы
Дайдзеин Биологическая активность: антиоксидантное, фитоэстроген		12, 13
Генистеин Биологическая активность: гипогликемическое, антиоксидантное, антиангиогенное, иммуносупрессорное, фитоэстроген, проявляет антибактериальную активность против <i>E. coli</i> и <i>Xanthomonas oryzae</i> , антагонист калмодулина		12, 13, 21
Формонетин Биологическая активность: фитоэстроген ! Возможный канцероген		19, 29
Прунетин Биологическая активность: фитоэстроген		12, 13, 29
Название флавоноида и его биологическая активность	Химическая формула	Источник литературы
5-О-метилгенистеин Биологическая активность: противовирусное		13, 19
Прунетин-4'-гликозид Биологическая активность: не изучено		19, 20
Генистин Биологическая активность: является ингибитором токсина, выделяемого штамма <i>E. coli</i> , противораковое, остеогенное		12, 19, 20, 32
Лютеолин Биологическая активность: фитоэстроген, противовоспалительное, антибактериальное, противовирусное, капилляроукрепляющее, спазмолитическое, антиаритмическое, противоязвенное, гепатопротекторное		12, 13

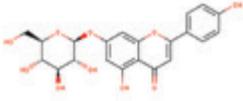
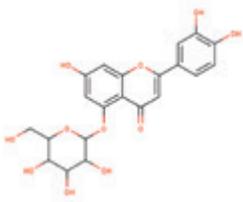
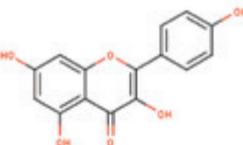
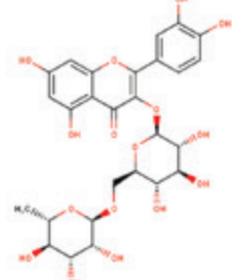
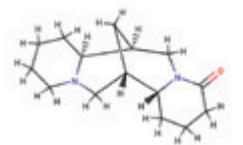
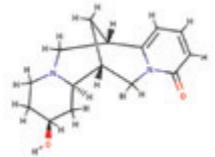
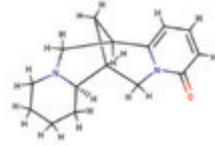
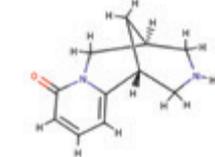
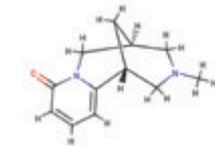
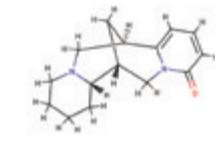
Название флавоноида и его биологическая активность	Химическая формула	Источник литературы
Космосин Биологическая активность: антиэстрогенное, противораковое		1, 12
Лютеолин-5-глюкозид Биологическая активность: фитоэстроген, противовоспалительное, антибактериальное, противовирусное, капилляроукрепляющее, спазмолитическое, антиаритмическое, противоязвенное, гепатопротекторное		12, 19, 32
Лютеолин-7-глюкозид Биологическая активность: противораковое		1, 12, 13
Кемпферол Биологическая активность: ингибитор MAO, нейпротектор		12, 19, 20
Мирицетин Биологическая активность: антиоксидантное, гиполлипидемическое, противоопухолевое		12, 29
Рутин Биологическая активность: ангиопротекторное		12, 20, 29

Таблица 3.

Алкалоиды, содержащиеся в растениях рода дроку

Название алкалоида и его биологическая активность	Химическая формула	Источник литературы
Лупанин Биологическая активность: антагонист никотина		12, 16

Название алкалоида и его биологическая активность	Химическая формула	Источник литературы
Батифолин Биологическая активность: не изучено		12, 16
Анагирин Биологическая активность: кардиотоническое (может вызвать тахикардию) !Высокотоксичен, терратогенен		12, 16
Цитизин Биологическая активность: антидепрессант, антагонист никотина		12, 16
N-метилцитизин Биологическая активность: антагонист никотина		12, 15
Термосин Биологическая активность: увеличивает продукцию слизи, усиливает сокращение бронхов		12, 16

Из других групп природных соединений, обнаруженных в видах рода, можно назвать: эфирное масло, кислоту аскорбиновую, сапонины, полисахариды, стероиды [7].

Основную часть эфирного масла, содержащегося в надземных частях дроку красильного, составляют карбонильные компоненты: (E)- β -ионон – 9,1%; дигидроактинидиолид – 7,3%; нонанал – 5,1%; гексагидрофарнесилацетон – 4,3% [7].

Анализ данных литературы, проведенный И. И. Озиминной и О. О. Фроловой, показывает, что растения трибы *Genisteeae* в плане хемосистематики изучались на содержание алкалоидов и флавоноидов. Французские исследователи, выбрав в качестве хемотаксономических признаков содержание алкалоидов, сделали вывод, что растения родов *Spartium* и *Genista* имеют один химический состав, и нет никаких оснований различать их с химической точки зрения и выделять в отдельные роды. Поэтому наиболее целесообразно применения флавоноидов в хемосистематике сложной в таксономическом плане трибы *Genisteeae* [5]. Установление структурных особенностей флавоноидов, характерных для определенных видов, позволяет прогнозировать вероятность обнаружения тех или иных структур в неизученном сырье и в то же время

показывает отличительные признаки растений трибы *Genistae*. Таким образом, решение проблемы хемосистематики растений трибы *Genistae* имеет научно-практическое значение. Следует отметить, что хотя растения рода *Genista* не относятся к пряно-ароматическим, для семи эндемичных видов рода, произрастающих на острове Сардиния, A. Bertoli и др. (2015) показана потенциальная роль компонентов эфирного масла в качестве важных хемотаксономических маркеров [11].

Многие виды рода известны как лекарственные растения народной медицины. Наиболее широко применяется *G. tinctoria*. Отвар и настой травы данного растения используются при отеках сердечного и почечного происхождения, гепатите, ревматизме, подагре, цистите, фурункулезе, дерматомикозах, аллергическом дерматите, скрофулезе, мигрени, при асците, астении, отложении солей, как диуретическое, желчегонное, слабительное, при венерических заболеваниях, переломах костей, рахите, заболеваниях щитовидной железы. В гомеопатии эссенция из свежей травы *G. tinctoria* – антибактериальное средство [7].

Биологическая активность ряда видов была подтверждена экспериментальными исследованиями. Так, установлено, что экстракт побегов *G. tinctoria* обладает гипотензивными, аналептическими, лактогенными и эстрогеноподобными свойствами. Метанольный экстракт побегов *G. tinctoria* ингибирует рост клеток линии M14 (меланома), водно-спиртовая настойка побегов проявляет антибактериальную активность [6, 7]. В ходе скрининговых исследований травы *G. tinctoria* в виде 30% настойки стандартными методами «зобной реакции» было подтверждено тиреоидстимулирующее действие [4]. В последних исследованиях эфирное масло *G. tinctoria* показало потенциальную противораковую активность [27].

Согласно экспериментальным данным, алкалоид патулидин, содержащийся в траве *G. patula*, обладает гипотензивными свойствами, стимулирует дыхание, снижает сердечный ритм, а флавоноиды надземной части проявляют антибактериальную активность. Извлечения из подземных органов *G. pilosa* проявляют активность в отношении грамотрицательных бактерий. Сумма флавоноидов из надземной части *G. transcaucasica* оказывает гипотензивное действие и урежает ритм сердца [7].

Исследования, проведенные A.P. Rauter с соавторами (2009) показали, что бутанольный экстракт *G. tenera* (эндемик острова Мадейра) в эксперименте ингибирует α -глюкозидазу и глюкозо-6-фосфатазу – двух ферментов, участвующих в углеводном обмене, что доказывает эффективность применения данного вида для контроля гликемии у больных сахарным диабетом 2 типа [26]. Позже D. Batista с соавторами (2015) было доказано, что данный экстракт помимо гипогликемического эффекта, который выше, чем у флоризина и акарбозы, обладает также противовоспалительным (за

счет ингибирования фермента циклооксигеназы) и антиоксидантным эффектом. При этом экстракт в неизменном виде попадает в желудочно-кишечный тракт и сохраняет свою антиоксидантную активность [10]. T. Lograda с соавторами (2010) установлено, что гидродистиллят *G. ulicina* и *G. vepres* (эндемики Алжира) обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* [22]. Этанольный экстракт *G. Lydia* также обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, и *Klebsiella pneumoniae*, а метанольный экстракт обладает выраженной противоопухолевой активностью, что было доказано в ходе исследований, проведенных A. B. Yildirim с соавторами [34]. S. Guettaf и др. (2016) показали, что водный экстракт *G. sacharae* обладает выраженной антиоксидантной активностью [17]. Было доказано, что благодаря антиоксидантной и эстрогеноподобной активности, изофлавоны, содержащиеся в растениях рода *Genista* обладают гепатопротекторным действием и нейтрализует гепатоксичность парацетамола, а также нейтрализуют токсичность бисфенола А (широко применяющегося в производстве поликарбонатного пластика, резины, упаковочного материала для пищевых продуктов, зубочисток) и метилпарабена (широко использующегося в качестве консерванта в многочисленных пищевых, косметических и фармацевтических продуктах), которые по данным многочисленных исследований при поступлении в организм в количестве, превышающем 50 мг/кг массы тела в день, могут вызвать рак предстательной железы, рак молочных желез, повреждение клеток печени, почек, мозга [9, 25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ литературных источников показал, что отечественные виды рода *Genista* нуждаются в проведении исследований, посвященных изучению их филогении с применением молекулярно-генетического, сравнительного морфолого-анатомического и фитохимического методов. Данные филогении необходимы для более четкой трактовки внешних признаков производящих растений. Анализ литературных данных о продуктах вторичного метаболизма видов рода *Genista* выявил, с одной стороны, неравномерную степень изученности видов, а с другой – довольно широкий спектр биологически активных соединений, обладающих различного типа биологической активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиева С. А. Флавоноиды *Genista transcaucasica* // Химия природных соединений. 1974. № 1. С. 113–114. [Alieva S. A. Flavonoids of *Genista transcaucasica* // Khimiya prirodnikh soedinenij. [Flavonoids

- Genista transcaucasica* // Chemistry of natural compounds.] 1974. № 1. P. 113–114.]
- Гончаров М. Ю., Повыдыш М. Н., Яковлев Г. П. Систематика цветковых растений / Под ред. д. б. н. Д. Д. Соколова. Санкт-Петербург, Изд.: СПХФА, 2015. С. 189. [Goncharov M. Yu., Povydysh M. N., Yakovlev G. P. Sistematika tsvetkovykh rastenii / pod. red. d. b. n. D. D. Sokolova. Sankt-Peterburg, Izdatel'stvo SPKhFA, [Systematics of flowering plants / Under. ed. db n D. D. Sokolov. St. Petersburg, Ed.: SPHFA] 2015. P. 189.]
 - Ковалев Н. В., Комаров В. Л., Костина К. Ф. и др. Флора СССР. Том 11. Бобовые (первая часть) / гл. ред. акад. В. Л. Комаров. СПб.-М., Изд.: АН СССР. 1941. С. 675. [Kovalev N. V., Komarov V. L., Kostina K. F. et al. Flora SSSR. Tom 11. Bobovye (pervaya chast') / gl. red. akad. V. L. Komarov. SPb., M., Izd-vo AN SSSR. [Flora of the USSR. V. 11. Legumes (first part) / ch. ed. Acad. V. L. Komarov. SPb.-M., Ed.: Academy of Sciences of the USSR.] 1941. 675 p.]
 - Кравченко В. Н., Георгиянц В. А., Владимиров И. Н. Изучение влияния лекарственных растений на функцию щитовидной железы // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2014. № 4. С. 149–154. [Kravchenko V. N., Georgiyanc V. A., Vladimirova I. N. Izuchenie vliyaniya lekarstvennykh rastenij na funkciyu shhitovidnoj zhelezy' // Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta. [Study of the effect of medicinal plants on the function of the thyroid gland // Bulletin of Vitebsk State Medical University.] 2014. № 4. С. 149–154.]
 - Озимина И. И., Фролова О. О. К вопросам хемотаксономии семейства Бобовых // Фундаментальные исследования. 2013. № 4. С. 873–882. [Ozimina I. I., Frolova O. O. K voprosam khemotaksonomii semejstva Bobovy'x // Fundamental'ny'e issledovaniya. [On the issues of chemotaxonomy of the legume family // Basic research.] 2013. № 4. P. 873–882.]
 - Паламарчук А. С., Бондаренко В. Е. Антимикробная активность и химический состав Дрока красильного // Раст. ресурсы. 1976. № 12. С. 229–232. [Palamarchuk A. S., Bondarenko V. E. Antimikrobnaya aktivnost' i khimicheskij sostav Drok krasil'nogo // Rast. resursy'. [Antimicrobial activity and chemical composition Drok dye // Rast. resources.] 1976. № 12. P. 229–232.]
 - Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 3. Семейства Fabaceae–Apiaceae / Отв. ред. А. Л. Буданцев. СПб.-М., Товарищество научных изданий КМК, 2011. С. 608. [Rastitel'ny'e resursy' Rossii. Dikorastushhie cvetkovy'e rasteniya, ix komponentny'j sostav i biologicheskaya aktivnost'. T. 3. Semejstva Fabaceae–Apiaceae / Otv. red. A. L. Budancev. SPb., M., Tovarishhestvo nauchny'x izdaniy KMK, [Plant resources of Russia. Wild flowering plants, their component composition and biological activity. V. 3. Families Fabaceae–Apiaceae / Ed. ed. A. L. Budantsev. SPb.-M., Association of scientific publications KMK.] 2011. P. 608.]
 - Черепанов С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). СПб., Мир и семья, 1995. 992 с. [Cherepanov S. K. Sosudistye rasteniya Rossii i sopredel'nykh gosudarstv (v predelakh byvshego SSSR). [Vascular plants of Russia and neighboring countries (within the former USSR).] Spb, Mir i sem'ya, 1995. 992 p.]
 - Baali N., Belloum Z., Baali S. et al. Protective Activity of Total Polyphenols from *Genista quadriflora* Munby and *Teucrium polium* geyrri Maire in Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Rats // Nutrients. 2016. V. 8(4). P. 193–200.
 - Batista D., Fale P. L., Serralheiro M. L et al. New In Vitro Studies on the Bioprofile of *Genista tenera* Antihyperglycemic Extract // Nat. Prod. Bioprospect. 2015. V. 7(6). P. 155–158.
 - Bertoli A., Loi M. C., Pistelli L. et al. Volatile constituents as complementary tools to characterize seven Sardinian *Genista* species // Biochemical Systematics and Ecology. 2015. V. 62. P. 82–90.
 - Bisby F. A., Buckingham J., Harborne J. B. et al. Phytochemical dictionary of the Leguminosae. Chemical constituents. London. Chapman and Hall. 1994. V. 2. P. 573.
 - Chopin J., Bouillant M. L., Harborn J. B. et al. C-glycosylflavonoids. London, Chapman and Hall. 1975. 816 p.
 - Cubas P., Pardo C., Tahiri H. Molecular approach to the phylogeny and systematics of *Cytisus* (Leguminosae) and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (trnL-trnF intergenic spacer) // Plant Syst. Evol. 2002. V. 233. P. 223–242.
 - Faugeras G., Paris M. Sur les alcaloïdes des fruits du *Genista pilosa* L.: caractérisation par chromatographie en phase gazeuse isolement de la cytosine // Compt. Rend. Des séances Acad. Sci. Paris. 1964. V. 258(13). P. 3113–3116.
 - Gill S. Chromatografia cienkowiastwowa I bibułowia alkaloidow chinolisydynowych w kilkugatuhkach z rodzaju *Cytisus* L. I *Genista* L. // Acta Poloniae Pharmaceutica. 1964.V. 4. P. 379–386.
 - Guettat S., Abidli N., Kariche S. et al. Phytochemical screening and antioxidant activity of aqueous extract of *Genista Saharæ* (Coss. & Dur.) // Der Pharmacia Lettre. 2016. V. 8(1). P. 50–60.
 - Hanganu D., Olah N. K., Benedec D. et al. Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of *Genista tinctoria* L. and *Genistella sagittalis* (L.) Gams (Fabaceae) // Pakistan journal of pharmaceutical sciences. 2016. V. 29(1). P. 301–307.
 - Harborne J. B. Chemosystematics of the Leguminosae. Flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe Genistae // Phytochemistry. 1969. V. 8. P. 1449–1456.
 - Ingham J. L., Lewis S. C., Bell T. D. et al. Naturally occurring isoflavonoids (18551981) // Fortschr. Chem. Org. Naturst. 1983. V. 23. P. 95–108.
 - Jagadeb M., Badirenath Konkimalla V., Rath S. N. et al. Elucidation of the Inhibitory Effect of Phytochemicals with Kir 6.2 Wild-Type and Mutant Models Associated in Type-1 Diabetes through Molecular Docking Approach // Genomics inform. 2014. V. 12(4). P. 283–288.
 - Lograda T., Chaker A. N., Chalchat J. C. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Genista ulicina* Spach. and *G. vepres* Pomel. // Nat. Prod. Commun. 2010. V. 5(5). P. 835–838.
 - Mabberley D. J. The plant book. A portable dictionary of the higher plants. New York, New Rochelle, Mellbourne, Sydney. 1987. 706 p.
 - Pardo C., Cubas P., Tahiri H. Molecular phylogeny and systematic of *Genista* (Leguminosae) and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (trnL-trnF intergenic spacer) // Plant Syst. Evol. 2004. № 244. P. 93–119.
 - Popa D. S., Bolfa P., Kiss B. et al. Influence of *Genista tinctoria* L. or methylparaben on subchronic toxicity of bisphenol A in rats // Biomedical and environmental sciences. 2014. V. 27(2). P. 85–96.
 - Rauter A. P., Martins A., Lopes R. et al. Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera* // Journal of Ethnopharmacology. 2009. V. 122. P. 384–393.
 - Rigano D., Russo A., Formisano C. et al. Antiproliferative and cytotoxic effects on malignant melanoma cells of essential oils from the aerial parts of *Genista sessilifolia* and *G. tinctoria* // Nat. Prod. Commun. 2010. V. 5(7). P. 1127–1132.
 - Rizzi Longo L., Feoli Chiapella L., Cusma Velari T. et al. Pollen cards of some eastern taxa of *Genista* L. sect. *Spartocarpus* Spach. (Cytiseae, Fabaceae) // Atti Soc. tosc. Sci. nat. 2010. V. 117(5). P. 33–44.
 - Swain T. Flavonoids as chemotaxonomic markers in plants // Pigm. Plants. 1981. V. 7. P. 224–236.
 - Taberlet P., Gielly L., Patou G. et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // Plant. Mol. Biol. 1991. № 17. P. 1105–1109.
 - Tsyppysheva. I. P., Petrova P. R., Baykova I. P. et al. Seasonal dynamics of alkaloids of *Genista tinctoria* L. growing at the Southern Ural Region // Natural Products. 2014. V. 10(7). P. 215–218.
 - Tůmová L., Tůma J. Dyer's Greenweed (*Genista tinctoria* L.): constituents and biological activity // Ceska a Slovenska farmacie. 2011. V. 60(2). P. 61–64.
 - White T. J., Bruns T., Lee S. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. USA, Academic Press. 1990. P. 586.
 - Yildirim A. B., Karakas F. P., Turker A. U. In vitro antibacterial and antitumor activities of some medicinal plant extracts, growing in Turkey // Asian Pacific journal of tropical medicine. 2013. V. 6(8). P. 616–624.

УДК 547.458

СИНТЕЗ КАРБОКСИЭТИЛАЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ

Т. И. Тарадейко^{1*}, М. В. Сидорова¹, А. А. Иозеп¹

Резюме. Проведен щелочной гидролиз амида карбоксиэтилальгиновой кислоты, полученного алкилированием альгиновой кислоты акриламидом. Осуществлен синтез ранее не описанной в литературе карбоксиэтилальгиновой кислоты. Изучены условия получения поликислоты. Исследована реакция ее этерификации. Показано влияние концентрации кислоты, времени реакции и степени карбоксиэтилирования полисахарида на степень этерификации и выход целевого продукта.

Ключевые слова: альгиновая кислота, карбоксиэтилальгиновая кислота, этиловый эфир карбоксиэтилальгиновой кислоты, полимераналогичная реакция.

SYNTHESIS OF CARBOXYETHYLALGINIC ACID AND ITS ETHYL ETHER

T. I. Taradeyko^{1*}, M. V. Sidorova¹, A. A. Iozep¹

Abstract. Alkaline hydrolysis of amide carboxyethylalginic acid, obtained by alkylation of alginic acid with acrylamide was carried out. The synthesis of carboxyethylalginic acid, which was not described before in the literature, was carried out. Conditions for obtaining polyacid were studied. The reaction of its esterification was investigated. The effect of acid concentration, reaction time and degree of carboxyethylation of the polysaccharide on the degree of esterification and the yield of the target product were shown.

Keywords: alginic acid, carboxyethyl alginic acid, ethyl ether of carboxyethyl alginic acid polymer analogous reaction.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., Saint-Petersbourg, 197376, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: tania91@bk.ru

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для лечения различных заболеваний используются десятки препаратов на основе альгиновой кислоты, которая выступает как в роли действующего, так и вспомогательного вещества («Топалкан», «Гевискон», «Калий альгалан», Альгипор, Альгимаф и др.), и их число с каждым годом возрастает [1, 2].

Полисахарид безвреден для живых организмов и, в той или иной степени, обладает противовоспалительным, регенерирующим, иммуномодулирующим, противомикробным действием и другими ценными свойствами. Благодаря этому альгиновая кислота и её производные используются для конструирования физиологически активных полимеров, синтез которых позволяет совершенствовать уже существующие и создавать новые лекарственные вещества [3,4]. Исследование активности соединений, полученных введением в молекулу альгиновой кислоты антимикробных веществ [5, 6], показали, что они, в целом, не снижают противомикробный эффект низкомолекулярной лекарственной субстанции, а в ряде случаев увеличивают его в 10–100 раз. В отличие от препаратов нитрофуранового ряда, они хорошо растворяются в воде и обладают высокой фунгицидной и фунгистатической активностью.

Наряду с альгиновой кислотой, продуктами её сульфатирования и карбоксиметилирования, для синтеза полимерных БАВ используются и производные карбоксиэтилальгиновой кислоты (КЭАК). Однако, пу-

бликации о методах синтеза самой КЭАК и её реакционной способности нам неизвестны. Предпринятая нами попытка синтеза КЭАК кислотным гидролизом её амидов, синтезированных алкилированием альгиновой кислоты акриламидом, оказалась неудачной [7]. Поэтому целью работы было исследовать реакцию щелочного гидролиза амида карбоксиэтилальгиновой кислоты (амид КЭАК) и реакцию этерификации синтезированной КЭАК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали альгиновую кислоту (CAS № 9005-32-7, Acrosorganics, США). Ранее методом гель-хроматографии на сефадексе G-200 было установлено [8], что она состоит из нескольких полисахаридных фракций с молекулярной массой до 200000 Да, которые после алкилирования альгиновой кислоты в основном сохраняются, изменяя лишь скорость элюирования из колонки. Содержание карбоксильных групп после переосаждения – 97%, а после очистки водной щелочью – 100%.

ИК спектры регистрировали в таблетках с KBr с помощью ИК Фурье-спектрометра ФСМ-1201 (ЗАО «ЛОИП», Россия). Оптическую плотность образцов определяли на фотоколориметре КФК-2 (Загорский оптико-механический завод, Россия). Для кондуктометрического титрования использовали лабораторный кондуктометр АНИОН-4120 (Сертификат Госстандарта RU.C.31.060.A № 25048, ООО НПП «Инфраспек-Аналит», Россия)

Алкилирование альгиновой кислоты в водной щелочи

2 грамма альгиновой кислоты **I** (рисунок 1) растворяли в водном растворе гидроксида натрия с концентрацией 3–7%. К раствору добавляли от 4,8 до 8,0 г акриламида (6–10 молей в расчете на 1 моль-эквивалент полисахарида). Реакционную массу перемешивали при 40 °С в течение 4 ч. Далее реакционную массу подкисляли уксусной кислотой до pH 8, продукт реакции **2** осаждали 5–7-кратным объемным избытком этанола. Осадок растирали в этиловом спирте, фильтровали, промывали спиртом и сушили в вакууме (20–25 мм рт. ст.) при 61 °С в течение 2 ч. Выход составил 73–84% от теоретического.

Щелочной гидролиз амидов карбоксиэтилальгиновой кислоты

Амид карбоксиэтилальгиновой кислоты **II** (рисунок 1) гидролизовали в 4,0 М NaOH в течение 7 суток при комнатной температуре. После выдержки реакционную массу подкисляли уксусной кислотой, продукт осаждали этанолом, осадок фильтровали, промывали этанолом и сушили в вакууме (20–25 мм рт. ст.) при 61 °С в течение 2 ч. Выход составил 70–84% от теоретического.

Получение Н-формы карбоксиэтилальгиновой кислоты

Натриевую соль карбоксиэтилальгиновой кислоты **III** (рисунок 1) растворяли в минимальном количестве дистиллированной воды, раствор пропускали через колонку с катионитом КУ-2-8 в H⁺ – форме, колонку промывают избытком дистиллированной воды до нейтральной реакции промывных вод по универсальному индикатору. Элюат упаривали досуха в вакууме (20–25 мм рт. ст.) при температуре 61 °С. Про-

дукт растирали и сушили в вакууме (20–25 мм рт. ст.) при 61 °С в течение 2 ч. Выход составил 53–101% от теоретического.

Синтез сложных эфиров карбоксиэтилальгиновой кислоты

В условиях автокатализа

Сложные эфиры карбоксиэтилальгиновой кислоты **V** (рисунок 1) получали ее нагреванием со спиртами (метиловым, этиловым и пропиловым) при температурах кипения реакционной массы в условиях автокатализа от 2 до 12 часов. По окончании выдержки спиртовой раствор упаривали досуха в вакууме (20–25 мм рт. ст.) при температуре не выше 50 °С. Продукт растирали и сушили в вакууме (20–25 мм рт. ст.) при 61 °С в течение 2 ч. Выход составил 85–90% от теоретического.

В условиях кислотного катализа

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, загружали 0,2 г карбоксиэтилальгиновой кислоты в H-форме **IV** (рисунок 1), приливали от 2 до 20 мл 0,025–0,1 М раствора HCl в спирте. Смесь выдерживали от 1 до 3 часов при температуре от 30–80 °С. По окончании выдержки, нерастворимый продукт отмывали спиртом от кислоты, центрифугировали, растирали и сушили в вакууме при нагревании (20–25 мм рт. ст., 61 °С) 2 часа. Спиртовой раствор упаривали досуха в вакууме (20–25 мм рт. ст.) при температуре не выше 50 °С. Растворимый в спирте продукт растирали и сушили в вакууме (20–25 мм рт. ст.) при 61 °С в течение 2 ч. Выход нерастворимого в спирте продукта составил 10–89% от теоретического.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Химическую модификацию альгиновой кислоты проводили по схеме:

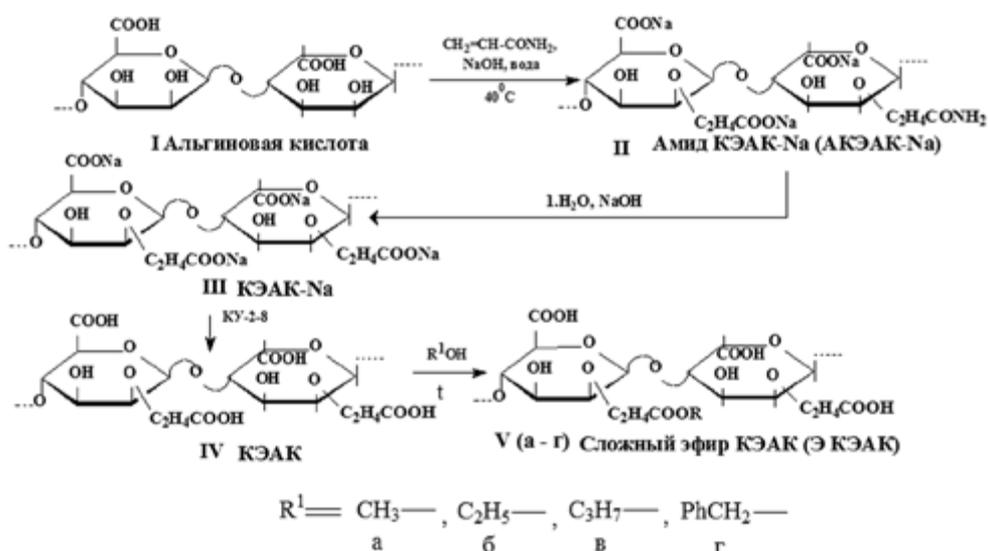


Рисунок 1. Схема химической модификации альгиновой кислоты

Альгиновую кислоту (I) алкилировали избытком акриламида в водной щелочи, как описано в работе [9]. В результате были получены образцы (II) со степенью аминокарбонилэтилирования ($C_{акэ}$ – количество групп $-OCH_2CH_2CONH_2$) от 0,14 до 0,97 и степенью карбоксиэтилирования ($C_{кэ}$ – количество групп $-OCH_2CH_2COONa$) – от 0,21 до 0,85 моль на моль-звено моносахаридного фрагмента.

Омыление амидов КЭАК (II) до карбоновых кислот осуществляли водным раствором щелочи в течение 7 суток при комнатной температуре. Реакционную массу подкисляли уксусной кислотой и целевой продукт (III) осаждали этанолом.

Натриевые соли КЭАК (III) представляют собой аморфные порошки от белого до кремового цвета, растворимые в воде, нерастворимые в этиловом спирте, ацетоне и большинстве обычных полярных и неполярных органических растворителей.

В ИК спектрах полученных продуктов гидролиза (III) наблюдаются полосы поглощения при 1580 и 1618–1620 $см^{-1}$, характерные для ν (COO^-) карбоксиэтильной группы и урановых кислот, соответственно. Полосы поглощения амидной группы (ν ($C=O$) «амид I» и δ ($N-H$) «амид II» в спектрах отсутствуют. Также изменилось соотношение полос поглощения в области 1000–1100 $см^{-1}$, в связи с частичным уменьшением числа эфирных связей ($C-O-C$) в полисахариде.

Число амидных групп в полисахаридных образцах рассчитывали по количеству азота, определенному методом с использованием реактива Несслера [10], а карбоксильных групп – по результатам кондуктометрического титрования. Полученные образцы КЭАК-На характеризовали степенью карбоксиэтилирования ($C_{кэ}$), а процесс гидролиза амида КЭАК – степенью элиминирования ($C_{Е-}$ % отщепившихся от полисахарида заместителей).

Таблица 1.

Результаты щелочного гидролиза некоторых образцов натриевых солей амидов КЭАК (4 MNaOH, 17–20 °C, 7 суток)

Характеристики амида КЭАК			$C_{кэ}$ КЭАК-На, в		$C_{Е-}$ в % от $C_{зо}$
$C_{акэ}$	$C_{кэ}$	$C_{зо}$	моль/моль	% от исходной $C_{кэ}$	
0,14	0,21	0,35	0,2	95	43
0,31	0,71	1,02	0,51	72	50
0,4	0,7	1,1	0,54	77	51
0,69	0,8	1,48	0,73	91	51
0,78	0,69	1,47	1,08	156	27
0,97	0,63	1,6	1,05	167	34

Как и в случае карбоксиэтилдекстрана [11], после выдержки образцов амида КЭАК в растворе щелочи амидные группы в продуктах реакции не обнаружены. Однако, степень элиминирования заместителей

(аминокарбонилэтильных и карбоксиэтильных) оказалась высокой: от 30 до 50%. Причем число карбоксиэтильных групп в полимере увеличивалось лишь при $C_{Е}$ около 30%, в остальных случаях оно уменьшалось. Вероятно, при такой концентрации щелочи помимо основной реакции от АК отщепляется как акриламид с последующим его гидролизом, так и акрилат натрия, поэтому увеличение числа карбоксиэтильных групп в полимере в большинстве случаев не наблюдается (таблица 1).

Карбоксиэтилальгиновую кислоту (IV) получали из её натриевой соли с помощью ионообменной хроматографии.

Полученные образцы представляют собой белые или кремово-желтые аморфные порошки растворимые в щелочных растворах и нерастворимые в воде, этиловом спирте, ацетоне и большинстве обычных полярных и неполярных органических растворителей.

В ИК спектрах образцов КЭАК, как и ожидалось, наблюдается широкая полоса поглощения при 1736–1742 $см^{-1}$, характерная для ν ($COOH$), и исчезают полосы поглощения карбоксилат-ионов при 1578–1580 и 1618–1620 $см^{-1}$ этилкарбоксильных групп и урановых кислот. Кроме того появилась комбинационная полоса поглощения в области 1248–1252 $см^{-1}$, характерная для водородных связей димеров карбоновых кислот.

Число карбоксильных групп в образцах КЭАК определяли кондуктометрическим титрованием, предварительно выдерживая анализируемый образец в титрованной щелочи 12 ч.

Таблица 2.

Характеристика образцов карбоксиэтилальгиновой кислоты, полученных с использованием катионита КУ-2-8.

$C_{кэ}$ КЭАК-На, моль/моль	$C_{кэ}$ КЭАК, моль/моль	Увеличение $C_{кэ}'$, %	Выход продукта, %
0,24	0,69	187,5	53
0,30	0,74	146,7	55
0,36	0,7	94,44	67
0,41	0,71	73,17	73
0,47	0,78	65,96	71
0,59	0,9	52,54	81
0,82	1,1	34,15	93
1,08	1,1	1,85	101

Обобщая результаты получения Н-формы КЭАК (таблица 2) следует отметить, что выход продукта, а также степень карбоксиэтилирования зависят от $C_{кэ}$ исходных образцов и условий выделения Н-формы.

При анализе полученных образцов карбоксиэтилальгиновой кислоты оказалось, что, как и в случае карбоксиметилальгиновой кислоты, число карбоксилатных групп, приходящее на моносахаридный фрагмент в Н-форме, больше, чем $C_{кэ}$ исходной соли

КЭАК-Na. При этом, чем больше $C_{кз}$ исходной соли, тем меньше разница в величинах степеней замещения в соли и в конечном продукте (рисунок 2).

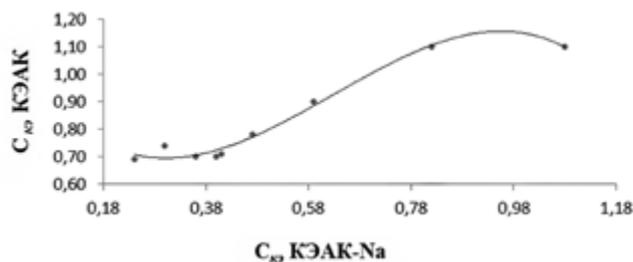


Рисунок 2. Влияние $C_{кз}$ исходной соли КЭАК-Na на $C_{кз}$ КЭАК

Это можно объяснить, прежде всего, неравномерностью алкилирования полисахарида, наличием в продукте реакции высоко-, низко- и вообще незамещенных молекул полимера, которые в Н – форме сильно отличаются по растворимости в воде и имеют разную скорость движения по хроматографической колонке. Молекулы Н – формы КЭАК с низкой степенью замещения, как и исходной альгиновой кислоты, не растворяются или плохо растворяются в воде, сорбируются на смоле и остаются в хроматографической колонке. При этом элюат обогащается высокозамещенными молекулами продукта.

В связи с этим, от $C_{кз}$ исходных образцов КЭАК-Na и условий выделения Н – формы сильно зависит и выход продукта, который увеличивается с повышением $C_{кз}$ исходной соли и достигает 90–100% при использовании солей КЭАК с $C_{кз}$ более 0,8 (таблица 2).

Вполне вероятно, что в процессе получения Н-формы из исходной соли КЭАК-Na с высокой степенью замещения (больше 1 моль/моль-звено полисахарида) может происходить частичное деалкилирование полисахарида с отщеплением акриловой кислоты, что зависит от времени пропускания раствора через колонку с катионитом [7]. Чем дольше образец находится в хроматографической колонке в кислой среде, тем больше вероятность отщепления карбоксиэтильных групп от полисахарида.

Для определения реакционной способности карбоксиэтилальгиновой кислоты (IV) её нагревали в избытке спирта в условиях автокатализа от 2 до 8 часов. Полученные эфиры КЭАК (V) представляют собой желтоватые аморфные порошки, растворимые в водной щелочи, нерастворимые в этиловом спирте, эфире и других полярных и неполярных органических растворителях.

В ИК спектрах образцов эфиров КЭАК увеличивается интенсивность полосы поглощения в области 1740 см^{-1} , соответствующей валентным колебаниям п

(C=O) карбоксильной группы и сложного эфира. После обработки образцов этилатом натрия в ИК спектрах обнаружены полосы поглощения при 1732 см^{-1} , характерных п(C=O) сложного эфира, при $1574\text{--}1578$ и $1618\text{--}1620\text{ см}^{-1}$, что соответствует п(COO⁻) этилкарбоксильных групп и урановых кислот, соответственно.

Количество сложноэфирных групп в эфире КЭАК определяли УФ спектроскопией и гидроксамовым методом. Число карбоксильных групп в образцах КЭАК определяли кондуктометрическим титрованием, как описано ранее.

Синтезированные продукты характеризовали степенью алкоксикарбонилэтилирования (C_{33} – число сложноэфирных групп, приходящее на моносахаридный фрагмент), а реакцию – степенью этерификации (C_3 – % прореагировавших карбоксильных групп).

Как и следовало ожидать, температура и время, а также длина углеродной цепи спирта оказывают существенное влияние на процесс этерификации (таблица 3). При этом, вполне ожидаемо, увеличение времени реакции повышает число сложноэфирных групп в полисахариде, температуры – увеличивает степень элиминирования, а длины радикала спирта – затрудняет образование эфиров.

К сожалению, образцы, полученные в условиях автокатализа, имеют значительно меньшее число сложноэфирных групп, чем ожидалось, что препятствует их дальнейшему использованию в химической модификации альгиновой кислоты.

Таблица 3.

Результаты этерификации образца КЭАК ($C_{кз}=0,6$) спиртами при их температуре кипения

Время реакции, ч	Метиловый $t_{кип}=64,7\text{ °C}$			Этиловый $t_{кип}=78,2\text{ °C}$			Пропиловый $t_{кип}=97,0\text{ °C}$		
	C_3 , %	$C_{кз}$, моль/моль	$C_{эф}$, %	C_3 , %	$C_{кз}$, моль/моль	$C_{эф}$, %	C_3 , %	$C_{кз}$, моль/моль	$C_{эф}$, %
2	–	–	–	6,0	0,51	7,5	–	–	–
6	15,1	0,48	5,5	8,3	0,49	10,0	8,0	0,43	21,2
12	27,3	0,38	9,5	17,7	0,41	13,0	12,0	0,33	33,1

Одним из способов повышения выхода продукта в реакции этерификации является кислотный катализ. Поэтому в дальнейшем этиловый эфир получали нагреванием КЭАК в избытке этанола в присутствии соляной кислоты.

Для определения условий получения сложных эфиров КЭАК в условиях кислотного катализа варьировали концентрацию кислоты, время и температуру реакции.

Как и ожидалось, при повышении концентрации соляной кислоты в спирте с 0,025 до 0,5 моль/л степень превращения карбоксильных групп в сложноэфирные увеличивается с 15 до 80% (время реакции 2 ч). При этом резко сокращается выход не растворимого в спирте продукта. Это связано: во-первых, с ростом липофильности и, следовательно, растворимости продукта в спирте при увеличении числа сложноэфирных групп в полимере; во-вторых, с деструкцией альгиновой кислоты и переходом ее низкомолекулярных этерифицированных фракции в спиртовую фазу (рисунок 3). Поэтому в дальнейшем использовали кислоту с концентрацией не более 0,05 моль/л.

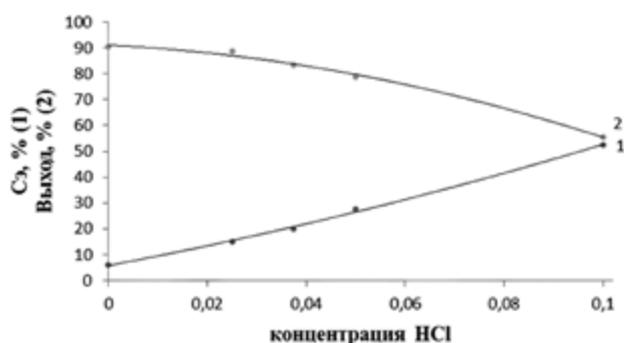


Рисунок 3. Влияние концентрации соляной кислоты в этаноле на степень этерификации КЭАК (1) и выход не растворимого в спирте продукта (2) ($C_{кэ}=0,4$; 2 ч; 80 °С)

Более подробное изучение влияния времени и температуры на результаты реакции КЭАК с 0,05 М спиртовым раствором НСl, показало, что с увеличением длительности процесса с 1 до 3 часов, степень этерификации возрастает с 15 до 42,5%, а с повышением температуры от 30 до 80 °С за 2 часа — с 13 до 46%. При этом выход целевого продукта менялся от 15% до 51% в зависимости от образца КЭАК, поэтому нами исследовано влияние числа карбоксиэтильных групп на результаты этерификации КЭАК.

Оказалось, что с увеличением степени карбоксиэтирования альгиновой кислоты число сложноэфирных групп в полисахариде возрастает (с 0,11 моль на моносахаридный фрагмент при $C_{кэ}=0,04$, до 0,62 — при $C_{кэ}=0,78$) (таблица 4). При этом растет и степень этерификации до 79,5%. Что можно объяснить увеличением концентрации карбоксильных групп в реакционной массе и повышением доли карбоксиэтильных групп в молекуле альгиновой кислоты, способных более активно реагировать со спиртом, чем уроновые кислоты. Так, при концентрации НСl 0,05 моль/л за два часа в реакцию этерификации альгиновой кислоты вступает всего лишь около 3% уроновых кислот. Как и следовало ожидать, с увеличением $C_{кэ}$ КЭАК и повышением степени этерификации выход целевого продукта падает, что связано с увеличением липофильности

и растворимости в спирте высокозамещенных образцов эфиров КЭАК. В связи с этим в дальнейшем выбор условий этерификации КЭАК осуществляли в зависимости от характеристики образца поликислоты и от требуемых параметров целевого продукта.

Таблица 4.

Влияние степени карбоксиэтирования на результаты этерификации КЭАК этанолом ($C(НСl)=0,05$ моль/л; 2 ч; 80 °С)

$C_{кэ}$, моль/моль	Характеристика продукта, не растворившегося в спирте		
	$C_{э}$, моль/моль	$C_{э}$, %	Выход, %
0	0,03	–	83,5
0,4	0,11	27,50	78,7
0,55	0,29	52,73	60,8
0,58	0,35	60,34	34,9
0,74	0,53	71,62	14,6
0,78	0,62	79,49	14,3

Количество сложноэфирных групп в образцах этилового эфира КЭАК, выделенных из спиртового раствора, гораздо выше, чем в образцах, не растворимых в спирте. С увеличением концентрации соляной кислоты $C_{э}$ и выход таких продуктов возрастает. Так же оказалось, что при концентрации кислоты больше 0,1 моль/л содержание сложноэфирных групп больше, чем количество карбоксиэтильных групп в исходном полисахариде и степень этерификации достигает 132,5%. Вероятно, в этих условиях в реакцию этерификации вступают не только введенные в альгиновую кислоту карбоксиэтильные фрагменты, но и уроновые кислоты. В связи с этим, смешанные эфиры, не пригодные для изучения реакционной способности сложных эфиров КЭАК, из спиртового раствора в дальнейшем не выделялись.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом:

1. Щелочным гидролизом амидов КЭАК впервые были получены натриевые соли карбоксиэтилальгиновой кислоты.
2. Карбоксиэтилальгиновую кислоту можно получать из её соли методом ионного обмена, используя колонку с катиониты типа КУ-2-8 (в H^+ -форме). При этом отделяется низко замещенная фракция полисахарида и повышается степень карбоксиэтирования продукта.
3. Степень превращения карбоксильных групп в сложные эфиры в реакции карбоксиэтилальгиновая кислота со спиртами в условиях автокатализа не достаточна для дальнейшей модификации альгиновой кислоты. Повышение температуры (выше 70 °С) и времени реакции не позволяет суще-

ственно увеличить число сложноэфирных групп в полисахариде.

4. В условиях кислотного катализа степень этерификации КЭАК увеличивает до 80%. При этом с увеличением концентрации кислоты, времени реакции и степени карбоксиэтилирования КЭАК выход целевого продукта падает из-за растворения сложного эфира поликислоты в спирте и деструкции полисахарида.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства. 16-е издание. Изд.: «Новая волна». 2012. С. 1216. [Mashkovskij M. D. *Lekarstvennyye sredstva*. 16-e izdanie. Izd.: «Novaya volna». [Medicinal products. 16th edition. Ed.: New Wave.] 2012. P. 1216.]
2. *Mandel K. G., Daggy B. P., Bro-die D. A., Jacoby H. I.* Review article: alginate-raft formulations in the treatment of heartburn and acid reflux // *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2000. V. 14. P. 3–22. DOI: 10.1046/j.1365-2036.2000.00759.x.
3. *Huiguang Z., Rongyi L., Changyou G., Linxian F., Jicong S.* Surface engineering of poly (DL-lactic acid) by entrapment of alginate-amino acid derivatives for promotion of chondrogenesis // *Biomaterials*. 2002. V. 23. P. 3141–3148. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00058-3.
4. Патент RU 2283848 (2005). Способ получения конъюгатов альгиновой кислоты / Понеделькина И. Ю., Одинокоев В. Н., Лукина Е. С., Валиева Л. В., Джемилев У. М., Башкатов С. А., Суфиярова Р. Ш, Парфенова Т. И., Серик Е. М.; патентообладатель Институт нефтехимии и катализа РАН. – Заявл. 16.06.2005; опубл. 20.09.2006. [Patent RU 2283848 (2005). *Sposob polucheniya kon'yugatov al'ginovoj kisloty / Ponedel'kina I. YU., Odinokov V. N., Lukina E. S., Valieva L. V., Dzhemilev U. M., Bashkatov S. A., Sufiyarova R. SH, Parfenova T. I., Serik E. M.*; patentoobladatel' Institut neftekhimii i kataliza RAN. – Zayavl. 16.06.2005; opubl. 20.09.2006.] [Patent RU 2283848 (2005). Method for producing alginic acid conjugates / patent holder Institute of Petrochemistry and Catalysis, Russian Academy of Sciences. - Appl. 06.16.2005; publ. September 20, 2006.]
5. *Серебренникова Е. С., Давыдова В. Л., Гурина С. В., Иоэп А. А.* Изучение антимикробной активности некоторых производных альгиновой кислоты // *Проблемы медицинской микологии*. 2013. Т. 15. № 4. С. 60–62. [Serebrennikova E. S., Davydova V. L., Gurina S. V., Iozep A. A. *Izuchenie antimikrobnoj aktivnosti nekotoryh proizvodnyh al'ginovoj kisloty // Problemy medicinskoj mikologii*. [Study of the antimicrobial activity of some derivatives of alginic acid // Problems of medical mycology.] 2013. T. 15. № 4. S. 60–62.]
6. *Косарева Д. Н., Тарадейко Т. И., Галашева С. Н., Ананьева Е. П., Иоэп А. А.* Антимикробная активность N-арилденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018. № 3(24). С. 92–95. [Kosareva D. N., Taradejko T. I., Galasheva S. N., Anan'eva E. P., Iozep A. A. *Antimikrobnaya aktivnost' N-arilidengidrazidov karboksiehtilal'ginovoj kisloty // Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv*. [Antimicrobial activity of N-arylidene hydrazides of carboxyethylalginic acid // Development and registration of drugs.] 2018. № 3(24). P. 92–95.]
7. *Тарадейко Т. И., Сидорова М. В., Галашева С. Н., Иоэп А. А.* Особенности кислотного гидролиза амида карбоксиэтилальгиновой кислоты // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017. № 4(21). С. 78–81. [Taradejko T. I., Sidorova M. V., Galasheva S. N., Iozep A. A. *Osobennosti kislotnogo gidroliza amida karboksiehtilal'ginovoj kisloty // Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv*. [Features of acid hydrolysis of carboxyethylalginic acid amide // Drug development and registration.] 2017. № 4(21). P. 78–81.]
8. *Серебренникова Е. С., Мороз М. С., Черёмушкин А. И., Иоэп А. А.* Реакции карбоксиметилальгиновой кислоты с некоторыми N-нуклеофилами // *Бутлеровские сообщения*. 2012. Т. 31. № 7. С. 18–23. [Serebrennikova E. S., Moroz M. S., Cheryomushkin A. I., Iozep A. A. *Reakcii karboksimetilal'ginovoj kisloty s nekotorymi N-nukleofilami // Butlerovskie soobshcheniya*. [Reactions of carboxymethylalginic acid with some N-nucleophiles // Butlerov Communications.] 2012. T. 31. № 7. P. 18–23.]
9. *Тарадейко Т. И., Седелкина Т. М., Тарасова Т. А., Иоэп А. А.* Алкилирование альгиновой кислоты акриламидом // *ЖОХ*. 2016. Т. 86. Вып. 8. С. 1345–1349. [Taradejko T. I., Sedelkina T. M., Tarasova T. A., Iozep A. A. *Alkilirovanie al'ginovoj kisloty akrilamidom // ZHON*. [Alkylation of alginic acid with acrylamide // JOC.] 2016. T. 86. Vyp. 8. P. 1345–1349.]
10. *Сиггия С., Ханна Г. Дж.* Количественный органический анализ по функциональным группам. М.: Химия, 1983. С. 672. [Siggia S., Hanna G. Dzh. *Kolichestvennyj organicheskiy analiz po funkcional'nym gruppam*. М.: Himiya, [Quantitative organic analysis of functional groups. М.: Chemistry.] 1983. С. 672.]
11. *Иоэп А. А., Соколенко Д. В.* Химическая модификация микробных полисахаридов, или гликанов. – СПб.: Издательство «Менделеев». 2004. С. 72. [Iozep A. A., Sokolenko D. V. *Himicheskaya modifikaciya mikrobnih polisaharidov, ili glikanov*. – SPb.: Izdatel'stvo «Mendeleev». [Chemical modification of microbial polysaccharides, or glycans. – SPb.: Mendeleev Publishing House.] 2004. P. 72.]

УДК 615.3

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СУБСТАНЦИЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА СЕЛЕКТИВНУЮ АКТИВАЦИЮ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЙ NO-СИНТАЗЫ (ОБЗОР)

Е. С. Кокарева¹, В. В. Морозов¹, Я. М. Станишевский^{1*}, М. А. Журавлева¹,
Н. В. Ноздрихина¹, В. С. Орлова¹, Е. В. Орлова²

Резюме. В статье представлены сведения о строении, классификации и функциях NO-синтазы. Рассмотрены основные ингибиторы фермента, а также механизмы их действия. Среди веществ активирующих деятельность фермента, особое внимание было уделено веществам нуклеотидно-пептидной природы, на примере субстанции, выделенной из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* раса 14. Было установлено, что нуклеотидный препарат на основе субстанции, выделенной из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* раса 14. обладает более выраженным активирующим действием в сравнении с Т-активин, и способствует восстановлению функций фермента при таком заболевании, как сахарный диабет.

Ключевые слова: оксид азота (II), Ca^{2+} -зависимая NO-синтаза, нуклеотиды.

ANALYSIS ON THE INFLUENCE OF VARIOUS SUBSTANCES ON SELECTIVE ACTIVATION OF Ca^{2+} -DEPENDENT NO-SYNTASE (REVIEW)

E. S. Kokareva¹, V. V. Morozov¹, Ya. M. Stanishevskiy¹, M. A. Zhuravleva¹, N. V. Nozdryukhina¹, V. S. Orlova¹, E. V. Orlova²

Abstract. The article presents information on the structure, classification and functions of NO-synthases. The main inhibitors of the enzyme, as well as their mechanisms of action, are considered. Among the substances activating the activity of the enzyme, special attention was paid to substances of nucleotide-peptide nature, using the example of a substance isolated from *Saccharomyces cerevisiae* race 14, it was found that the nucleotide preparation based on a substance isolated from *Saccharomyces cerevisiae* race 14. has a more pronounced activating action in comparison with T-activin, and helps to restore the functions of the enzyme in diseases such as diabetes.

Keywords: nitric oxide (II), Ca^{2+} -dependent NO-synthase, nucleotides.

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

2 – ФГБН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН (ИТЭБ РАН), 142290, Россия, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3

1 – Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

2 – Institute of Theoretical and Experimental Biophysics (ITEB) RAS, 3, Institutskaya str., Puschino, Moscow District, 142290, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: stanyar@yandex.ru
Тел.: 8 (499) 936 85 99

ВВЕДЕНИЕ

Из огромного разнообразия внутриклеточных компонентов, обеспечивающих нормальное функционирование всего организма, пожалуй, самое большое значение имеют нуклеиновые кислоты и составляющие их мономерные звенья – нуклеотиды. Нуклеотиды, также, являются строительным материалом для многих коферментов, что позволяет им регулировать различные физиологические процессы организма. К числу таких процессов относят и синтез оксида азота – NO, который в свою очередь, также, имеет широкий спектр воздействий на различные функции организма.

В конце прошлого столетия было обнаружено, что оксид азота присутствует в любом живом организме и выступает как в роли активатора, так и в роли ингибитора многих метаболических процессов, и оказы-

вает регуляторное действие на сердечнососудистую, нервную, иммунную, дыхательную и пищеварительную системы.

Однако помимо положительного физиологического действия, NO также оказывает и пагубное влияние на организм. Свободнорадикальные продукты, образующиеся при окислении оксида азота, могут повреждать белки и ненасыщенные жирные кислоты, снижать активность большинства ферментов, нарушать целостность клеточных структур [1–2], разобщать окислительное фосфорилирование и снижать уровень АТФ в крови и клетках тканей млекопитающих, а также проявляют мутагенную и тератогенную активность.

В связи с этим, особое значение, в рассмотрении физиологической роли NO, имеет вопрос регуляции активности NO-синтазы (NOS) так, как этот фермент является ключевым компонентом, участвующим в синте-

зе оксида азота. Возможность регулирования активности NO-синтазы, открывает широкие перспективы в области изучения и лечения различных заболеваний и патологических состояний организма. Поэтому поиск и разработка лекарственных субстанций, в частности препаратов на основе природных нуклеотидов, в настоящее время, является одной из актуальнейших задач биологии, биохимии и медицины.

СТРОЕНИЕ И ОСОБЕННОСТИ ТКАНЕВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ NO-СИНТАЗ

Все NO-синтазы формируются как гомодимеры, вес субъединиц которых колеблется от 130 до 160 кДа [3–5]. N-терминальная часть любой NOS схожа на 29–32% с NADPH-цитохром-P450 редуктазой (CPR) [6], и содержит гем в виде железосодержащего протопорфирина IX – Fe-PPIX (как в P450) [7-8], тетрагидробиоптерин (BH_4), который регулирует активность и стабильность NOS и калмодулин-связывающий участок. D. K. Ghosh et al. [9], показали, что эти домены влияют на голова-голова субъединичную ориентацию NOS. Другие фрагменты в субъединице NOS содержат связывающие участки для NADPH, флавинадениндинуклеотида – FAD, и флавинмоноклеотида – FMN (рисунок 1).

В работе E. A. Sheta et al., (1994) было показано, что локализация гем-связывающей консенсусной последовательности в NH_2 -терминальной части NOS и связывающих последовательностей для нуклеотидов (FAD, FMN) в $COOH$ -терминальной части подтверждает бидоменную структуру NOS. Присутствие калмодулин-связывающей последовательности между Fe-PPIX и флавин-связывающими доменами энзима подтверждают роль CaM в частичной переориентации этих доменов, что влияет на каталитическую активность NOS [8].

Анализ структуры Fe-PPIX в NOS показал, что он является симметричной бипирамидой, где одна вершина SH-группа, а другая – свободная электронная пара, то есть железо в NOS является 5-координированным, что обуславливает не только ингибирование NOS продуктом (NO) [10], но и формирование нескольких пространственных структур при связи Fe с пятым лигандом [11].

Особый интерес представляет Ca^{2+}/CaM -связывающий домен NOS, так как наличие или отсутствие зависимости изоформы NOS от Ca^{2+} является одним из основных признаков разделения NOS на изоформы.

NO-синтазы классифицируют на 3 типа: нейрональную (nNOS), индуцибельную (макрофагальную) (iNOS) и эндотелиальную (eNOS). Эта классификация основана на физических и биохимических характеристиках фермента, то есть на субклеточной локализации и регуляции Ca^{2+} . Данные по этой классификации, составленной по результатам исследований молекулярного клонирования и экспрессии, представлены в таблице 1.

nNOS и eNOS являются конститутивно экспрессируемыми, в то время как iNOS не является конститутивно экспрессируемой в большинстве образцов, и ее экспрессия индуцируется (липополисахаридом) LPS и/или (интерфероном) IFN посредством индукции ими промотора – бактериальной хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT). После экспрессии, iNOS необратимо связывает CaM, независимо от Ca^{2+} и остается максимально активной, независимо от концентрации свободного Ca^{2+} .

СИНТЕЗ ОКСИДА АЗОТА В ОРГАНИЗМЕ

Процесс окисления терминального азота L-аргинина до цитруллина является центральным в NOS-катализе [13–16]. При этом в реакции трансформации L-аргинина принимают участие железосодержащий протопорфирин IX (Fe-PPIX) в активном центре, фламинадениндинуклеотид – FAD, фламинмоноклеотид – FMN и тетрагидробиоптерин – BH_4 в качестве коферментов, а также O_2 и NADPH как косубстраты.

NO-синтаза катализирует окисление гуанидилового азота L-аргинина до монооксида азота (NO) и цитруллина через промежуточную стадию образования гидрокси-L-аргинина [17–18] (рисунок 2). Для получения 1 моля NO затрачивается 1,5 молей NADPH/ H^+ .

Реакция идет с аномальным переносом 5 электронов на гуанидиновый азот субстрата L-Arg. Так как обычно электроны переносятся попарно с NADPH на флавиновые кофакторы, (то есть $NADPH/H^+ \rightarrow NADPH^+ + 2H^+ + 2e^- \rightarrow FADH_2 \rightarrow FMNH_2$), то можно говорить о двух фазах данного процесса, в результате кото-

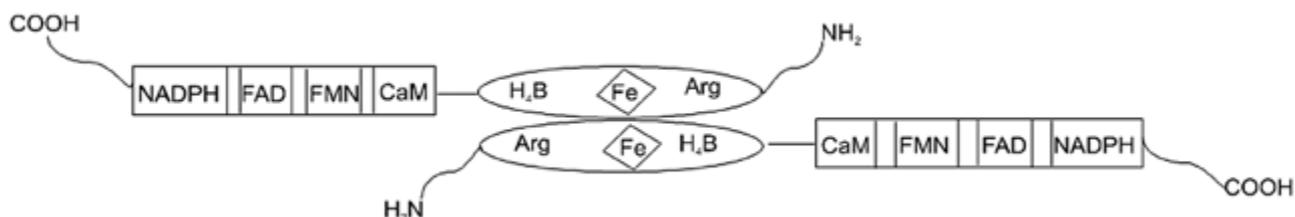


Рисунок 1. Структура и субъединичная ориентация бидомена NOS (по Ghosh D.K. et al. 1995)

Таблица 1.

Классификация и характеристики изоформ NOS [12]

Тип	nNOS	iNOS	eNOS
Источник	мозг	макрофаги	эндотелий
Расчетная масса ^a , кДа	160	130	133
V_{max} , $\mu\text{M NO}^2 \text{ min/mg}$	0,3–3,4	0,9–1,6	0,8–6,5
Нативная структура	димер	димер	Димер
Найденные центры связывания	FAD, FMN, NADPH, CaM		
1. Флавиновые места	FAD, FMN, NADPH		
Дифенилен йодониум	ингибирует	ингибирует	не изучено
NADPH диальдегид к NADPH местам	ингибирует	ингибирует	ингибирует
2. CaM места: ответственность за активность	да	нет, кроме печени	да
Постулированные центры связывания	L-Arg, H ₄ B, O ₂ , PPIX		
1, L-Arg место: Km, $\mu\text{M L-Arg}$	2–4,3	2,8–3,6	3,9–7,4
L-NNA, IC ₅₀ (μM)	0,9	212 ^c	0,2
2. PPIX место: влияние CO, NO	ингибирует		
Регуляция экспрессии:			
1. Конститутивная, IFN	да	нет, кроме макрофагальной NOS, которая конститутивно экспрессируется в гладкомышечных клетках и в почках	да
2. TFN, LPS, IL-1	подавляет	индуцирует	подавляет
3. Глюкокортикоиды	нет эффекта	ингибирование индукции	нет эффекта
4. TGF, IL-4, 10	не изучено	ингибирование индукции	не изучено
Посттранскрипционные модификации:			
1. Фосфорилирование	Ser/Thr	не изучено	не изучено
2. Необратимое калмодулиновое связывание	нет	да	нет
3. Ацилирование	не изучено	не изучено	миристоляция
Субклеточная компартментализация:			
растворимая фракция	90–100%	85–90%	5%

рых NOS возвращается в свое исходное термодинамическое состояние (рисунок 3).

В фазе 1 L-Arg гидроксилируется до OHArg, который нуждается в 1 моле NADPH (донор e⁻). В фазе 2 окисление OHArg до цитруллина и NO требует 0,5 молей NADPH и обязательного присутствия BH₄.

В соответствии с этими представлениями, молекулярный кислород связывается с NO и L-цитруллином в результате двух фаз. Флавиновые кофакторы FAD и FMN, цитохром P450-редуктазный домен NOS могут регулировать электронный перенос с 1,5 молей NADPH на молекулярный кислород в одной или

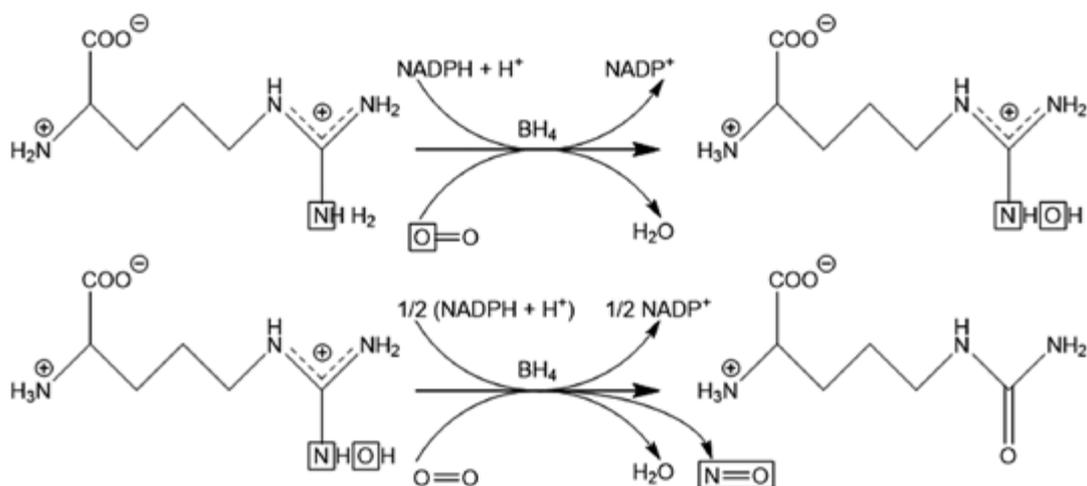


Рисунок 2. Образование NO

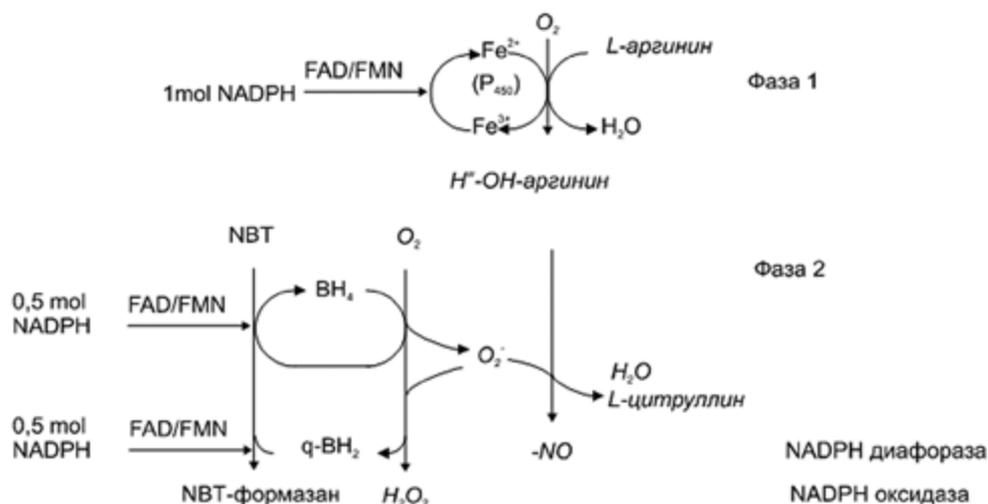


Рисунок 3. Фазы биосинтеза NO в организме

обеих фазах. Флавиновые кофакторы и тетрагидробиоптерин (BH_4) также включаются в электронный перенос [19], и принимают участие в NADPH-зависимом процессе возвращения NOS в исходное состояние.

Образовавшийся оксид азота в дальнейшем быстро диффундирует через клетку мембраны, в которой он был синтезирован, и далее, не требуя наличия каких-либо рецепторов, также быстро проходит через мембрану клетки-мишени. Нейтральный заряд и малые размеры молекулы оксида азота определяют высокую скорость диффузии, что в свою очередь позволяет идентифицировать её, как нейромедиатор.

Ещё одним важным свойством NO является его способность снижать внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} посредством влияния на активность гуанилатциклазы и аденозиндифосфат (ADP)-рибозилтрансферазы [20]. Также NO участвует в антиоксидантной защите организма, замедляя пероксидное окисление липидов, непосредственно взаимодействуя с супероксид-анионом, что было доказано в опытах *in vitro* [21–22].

Однако при высоких концентрациях, NO проявляет сильное цитотоксическое действие как на здоровые клетки, так и на вредоносные. Тем не менее короткое время жизни молекулы NO не позволяет распространять его канцерогенное действие на целый организм, а только лишь на близлежащие клетки.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ NO-СИНТАЗ

Концентрация NO в клетке, которая, как правило, является прямым продуктом NOS, играет чрезвычайно важную роль в осуществлении многих физиологических процессов в организме и в регуляции фармакологического действия ряда лекарственных препаратов. С недостатком NO различные авторы свя-

зывают развитие таких заболеваний, как диабет; атеросклероз [44] и гиперхолестеремия.

Избыток NO в организме так же опасен, как и его недостаток. Избыточное содержание NO в организме наблюдается при различных заболеваниях. В этой связи большой практический интерес представляет рассмотрение веществ-ингибиторов NO и анализ механизмов их ингибирующего действия (таблица 2).

Особую группу ингибиторов активности NOS составляет ряд физиологически активных соединений, которые являются ингибиторами индукторов NO-синтазы. Iuvone J., et al, [24] было показано, что такие опиоиды, как D-Ala²-N-метил-Phe⁴-Gly⁵-ол-энкефалин (DAGO) (селективный агонист μ -рецепторов), морфин (агонист μ - и κ -опиоидных рецепторов), транс(\pm)-3,4-дихлоро-N-метил-N(2-(1-пирролидинил) циклехсил) бензен ацетамид (U50-488H) (селективный агонист κ -рецепторов), добавленные в концентрациях 10^{-10} – 10^{-6} М к макрофагальным клеткам J774, активированными LPS, значительно снижали продукцию NO. Данный эффект снимался налоксоном (10^{-12} – 10^{-8} М), который является специфическим опиоидным антагонистом.

Другими ингибиторами индукции iNOS из макрофагов линии J774 являются такие глюкокортикоиды, как дексаметазон (0,001 М – 1 мкМ) и гидрокортизон (0,01 М – 10 мкМ). Их действие снималось эквивалентными концентрациями кортексолона. Остеопонтин (OPN) (Arg-Gly-Asp-фосфопротеин), выделенный из культуры клеток почки человека, является супрессором индукции iNOS, индуцированной LPS.

В настоящее время отсутствуют надежные сведения об активаторах NO-синтазы. Как правило, речь идет о возможной активирующей роли таких индукторов NOS, как интерферон – γ (IFN- γ) и бактериальный липополисахарид (LPS), так как для данных веществ была показана их роль как типичных индукторов mRNA NO-синтазы.

Таблица 2.

Классификация и механизм действия ингибиторов NO-синтазы

Тип ингибиторов	Механизм ингибирования	Дополнительные сведения и примечания
Аналоги и производные аргинина:	Конкурирование с аргинином	Некоторыми видами клеток могут быть метаболизированы до L-аргинина или L-цитруллина, что иногда приводит к парадоксальной стимуляции NOS. Действуют при физиологических значениях температуры и pH
-N ^ω -мометил-L-аргинин (L-NMMA)	Конкурентное, неселективное ингибирование всех NOS	
-N ^ω -диметил-L-аргинин (L-ADMA)	Конкурентное, неселективное ингибирование всех NOS	
-N ^ω -нитро-L-аргинин (L-NNA) -7-нитроиндазол -Фенилдиазен	Необратимое, селективное ингибирование nNOS	Некоторыми видами клеток могут быть метаболизированы до L-аргинина или L-цитруллина, что иногда приводит к парадоксальной стимуляции NOS. Действуют при физиологических значениях температуры и pH
-N ^ω -иминоэтил-L-орнитин (L-NIO) -L-канаванин -N ^ω -амино-L-аргинин	Необратимое, селективное ингибирование iNOS	Ингибируют макрофагальную iNOS более активно, чем конститутивную, нейрональную или эндотелиальную NOS. Действуют при физиологических значениях температуры и pH
Дифенилениодоний	Конкурирование с NADPH. Конкурентное необратимое ингибирование NAD(P)H-флавиновых центров фермента	Ингибирует также супероксид-генерирующую NADPH-оксидазу и митохондриальную NADH-оксидазу. Степень ингибирования зависит от времени экспозиции и температуры
Антагонисты калмодулинов:	Конкурирование с калмодулином	Ингибирует другие калмодулин-зависимые ферменты. Индуцируют Ca ²⁺ -независимую NOS в печени крыс. Нарушение транспорта переноса e ⁻
-Трифторперазин -Хлорпромазин -Калмидозалий хлорид (R24571)	Неконкурентное ингибирование Ca ²⁺ -зависимой nNOS и eNOS	
Ингибиторы синтеза тетрагидриобипте-рина:	Смешанный	
-2,4-диамино-6-гидроксипиримидин (DAHP)	Ингибирование GTP-циклогидролазы-I	Ингибирует другие калмодулин-зависимые ферменты. Индуцируют Ca ²⁺ -независимую NOS в печени крыс. Нарушение транспорта переноса e ⁻
-метотрексат	Ингибирование дигидроптеридинредуктазы	
NO, CO, метиленовый синий, Zn ²⁺	Ингибирование посредством взаимодействия с геном NO-синтазы	Ингибирование nNOS и макрофагальной iNOS. Лигандирование 6-свободной связи в PPIX-домене NOS

Однако на данный момент имеются сведения еще об одном препарате, оказывающем активирующее действие на NOS. Этот препарат представляет собой субстанцию нуклеотидно – пептидной природы, выделенную из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* раса 14 [25].

В состав субстанции входит большое количество аминокислот, витаминов, жирных кислот, а также макро и микроэлементов содержание которых представлено в таблице 3.

Однако основной вклад, определяющий эффективность полученного комплекса, вносит наличие адениновых нуклеотидов, которые обладают достаточно высокой биологической активностью.

Данный препарат, в дозах 0–100 мг/кг, проявлял высокую активирующую способность. Исследования, проводимые на интактных крысах Wistar, и на крысах с диабетом первого и второго типа показали, что при сравнении активирующего действия полученной нуклеотидной субстанции в дозе 10 мг/кг с действием иммуномодулятора Т-активина, K_m субстанции в 2,6 раза меньше, чем таковая у Т-активина. Скорость NOS-катализирующей реакции, в случае с нуклеотидным комплексом, также была выше. У крыс с диабетом 2 типа, после 7 дневного приема препарата, в до-

зе 100 мг/кг, значительно снижался уровень глюкозы в крови за счет роста уровня секретируемого инсулина.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что нуклеотидный препарат обладает более выраженным активирующим действием и способствует восстановлению функций фермента при таком заболевании, как сахарный диабет [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведя анализ литературных данных, было установлено, что в настоящее время отсутствует достаточное количество информации о механизмах активирующего действия различных веществ на NOS. С этим связано и малое количество примеров таких веществ. Однако изучение и разработка препаратов способных активировать деятельность NOS не стоит на месте и становится все более актуальной задачей современности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ по Программе реализации комплексных проектов по созданию высокотехнологичного производства (Постановление Правительства РФ № 218 от 09.04.2010 г. шифр конкурса 2016-218-09). Договор № 03.G25.310258.

Таблица 3.

Состав комплексного нуклеотидного препарата,
100 мг/г сухого препарата [25]

Компоненты комплексного нуклеотидного препарата			
Адениновые нуклеотиды (АН), аминокислоты		Витамины	
АН	2800	В1 (тиамин)	0,58
Аминокислоты:		В2 (рибофлафин)	7,15
Лизин	0,78	Ниацин (витамин РР)	10,8
Гистидин	0,39	Холин	253,0
Аргинин	0,64	Пантотеновая кислота	42,5
Аспарагиновая кислота	1,17	В6 (пиридоксин)	0,59
Треонин	2800	В1 (тиамин)	0,58
Серин	0,78	Ниацин (витамин РР)	10,8
Глутаминовая кислота	0,39	Холин	253,0
Пролин	0,64	Пантотеновая кислота	42,5
Глицин	1,17	В6 (пиридоксин)	0,59
Аланин	1,26	Фолиевая кислота	0,83
Валин	0,5	В12 (цианокобаламин)	0,05
Метионин	0,21		
Изолейцин	0,34	Н (биотин)	0,05
Лейцин	0,42	К (филлохинон, пренил-менахинон)	0,62
Тирозин	0,35		
Фенилаланин	0,35		
Цистеин	0,46	Е (токоферол)	0,36
Фосфор	130	Миристиновая	0,023
Калий	294	Миристолеиновая	0,015
Натрий	36,5	Пентадигановая	0,045
Кальций	43,8	Пальмитиновая	2,2
Магний	47,6	Пальмитолеиновая	8,58
Медь	0,2	Маргариновая	0,22
Кобальт	0,16	Гептадеценная	0,23
Железо	1,03	Стеариновая	1,075
Марганец	0,32	Олеиновая	6,525
Цинк	0,19	Линолевая	0,35
Никель	0,17	Линоленовая	0,48
Хром	0,23	Арахидиновая	0,25
		Гадолеиновая	0,65
Молибден	0,35	Арахидиновая	0,30
		Бегеновая	0,05

ЛИТЕРАТУРА

- Lipton S. A., Choi J. B., Pan Zh. H. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 1993. V. 364. P. 626–632.
- Бердиев У. Б., Кузнецов Ю. П., Ку克林 П. Г., Реутов В. П., Шекшеев Э. М. Моделирование спектров ЭПР парамагнитных центров крови на персональных ЭВМ типа IBM PC/XT/AT. М, Ин-т хим. физики АН СССР. 1989. С. 208. [Berdiev U. B., Kuznecov Ju. P., Kuklin P. G., Reutov V. P., Shekshchev E. M. Modelirovanie spektrov JePR paramagnitnyh centrov krovi na personal'nyh JeVM tipa IBM PC/XT/AT. M, In-t him. fiziki AN SSSR. [Simulation of the EPR spectra of paramagnetic blood centers on personal computers such as IBM PC / XT / AT. M, Institute of Chemical Physics, USSR Academy of Sciences.] 1989. P. 208.]
- Xie O. W., Cho H. J., Galaycay J., Mumford R. A., Swiderek K. K., Lee T. D. Science. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. 1992. V. 256. P. 225–228.
- Sessa W. C., Harrison J. K., Barber C. M., Zeng D. J. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *Biol. Chem.*, 1992. V. 267. P. 15274–15276.
- Lowenstein G., Glatt C. S., Bredt D. S. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Snyder. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 6711–6715.
- McMillan K., Masters B. S. S. Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as Cysteine-415 / *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 3686–3693.
- Wang J., Shin W. S., Kawaguchi H., Inukai M., Kato M., Sakamoto A. Contribution of sustained Ca²⁺-elevation for NO production in endothelial cells and subsequent modulation of Ca²⁺ transient in vascular smooth muscle cells in coculture / *J.B.C.*, 1996. V. 271. P. 5647–5651.
- Sheta E. A., McMillan K., Masters B. S. S. Evidence of a bidomen structure of constitutive cerebellar nitric oxide synthase / *J.Biol.Chem.*, 1994. V. 269. P. 15147–15153.
- Ghosh D. K., Stuehr D. I. Macrophage NO synthase: characterisation of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction / D. K. Ghosh, D. I. Stuehr. *Biochemistry*, 1995. V. 34. P. 801–807.
- Rousseau D. L., Einstein A. Substrate-ligand interactions in nitric oxide synthase / *Microsomes and drug oxidations N-Y Acad. Press*, 1996.
- Baserga R., Peruzzi F., Reiss K. The IGF-1 receptor in cancer biology / *J. Cancer*. 2003. V. 107. № 6. P. 873–877.
- Cho H. J., Xie O. W., Galaycay J., Mumford R. A. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophage / *J. Exp. Med.*, 1992. V. 176. P. 599–604.
- Knowles R. G., Moncada S. Ca²⁺-mobilizing system can activate NO-synthase in endothelium-derived coculture / *Trends. Biochem. Sci.*, 1992. V. 17. P. 399–402.
- Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A. Biohynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication / *Biochem. pharmacol.*, 1989. V. 38. P. 1709–1715.
- Hevel J. M., White K. A., Marletta M. A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase / *JBC*. 1991. V. 266. P. 22789–22791.
- Chen P., Tsai A., Wu K. K. Systeine 99 of endothelial nitric oxide synthase (NOS III) is for tetrahydrobiopterin-dependent NOS III stability and activity. / *B.B.R.C.* 1995. V. 215. P. 1119–1129.
- Kwon N. S., Nathan C. F., Griffith O. W., Matthews D. E., Stuehr D. J. a-Citrulline Production from a-Arginine by Macrophage Nitric Oxide Synthase / *JBC*. 1990. V. 265. P. 13442–13445.
- Stuehr D. J., Griffith O. W. Mammalian Nitric Oxide Synthases. / *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1999. V. 1411. P. 217–230.
- Klatt P., Heinzel B., John M., Mayer B. P450 in vivo reduction by NOS and its participation in opiate utilizing processes / *J. Biol. Chem*. 1992. V. 267. P. 11374–11378.
- Паршина С. С. Современные представления о биологических эффектах оксида азота и его роли в развитии сердечно-сосудистой патологии. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. Т. 5. № 1. 2006. С. 88–94. [Parshina S. S. Sovremennye predstavlenija o biologicheskikh jeffektah oksida azota i ego roli v razvitiij kardiovaskuljarnoj patologii. Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika. [Modern ideas about the biological effects of nitric oxide and its role in the development of cardiovascular disease. Cardiovascular therapy and prevention.] Т. 5. № 1. 2006. P. 88–94.]
- Нарциссов Я. П., Серая И. П. Современные представления о биологической роли оксида азота. Успехи современной биологии. 2002. № 3. С. 249–257. [Narcissov Ja. P., Seraja I. P. Sovremennye predstavlenija o biologicheskoi roli oksida azota. Uspеhi sovremennoj biologii. [Modern ideas about the biological role of nitric oxide. Successes of modern biology.] 2002. № 3. P. 249–257.]
- Weinberger B., Laskin D. L., Heck D. E., Laskin J. D. The toxicology of inhaled nitric oxide. *Toxicol Sci*. 2001. № 59(1). P. 5–16.
- Drexler H., Zeiher A. M., Meinzer K., Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine / *Lancet*. 1991. V. 338. P. 1546–1550.
- Shi Y. Caspase activation: revisiting the induced proximity model / *Cell*. 2004. P. 855–856.
- Орлова Е. В., Орлова В. С., Марахова А. И., Станишевский Я. М. Комплексный нуклеотидный препарат из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Аналитика. 2018. № 1(38). С. 64–68. [Orlova E. V., Orlova V. S., Marahova A. I., Stanishevskij Ja. M. Kompleksnyj nukleotidnyj preparat iz drozhzhej *Saccharomyces cerevisiae*. Analitika. 2018. № 1(38). P. 64–68.]

УДК 615.3

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СУБСТАНЦИЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА АКТИВНОСТЬ КАСПАЗ (ОБЗОР)

Е. С. Кокарева¹, В. В. Морозов¹, Я. М. Станишевский^{1*}, М. А. Журавлева¹, А. В. Зубков²

Резюме. В работе представлен обзор строения и функций ферментов семейства каспаз. Рассмотрены основные этапы и пути развития программируемой клеточной гибели – апоптоза. Продемонстрированы механизмы ингибирования и активации каспаз, и их роль в апоптозе клеток. Отдельные этапы активации каспаз в организме остаются ещё недостаточно исследованными. В настоящее время, подробно изучены строение, свойства, ключевые моменты функционирования и регуляции каспаз в организме, однако на молекулярном и клеточном уровнях, недостаточно для непосредственного регулирования их деятельности. Современные исследования влияния искусственно созданных субстанций различной природы на эти ферменты, в свою очередь, открывают перспективы для дальнейшего поиска методов их регуляции что, в свою очередь, позволило бы использовать полученные знания в лечении онкологических, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: апоптоз, каспаза, нуклеотиды, субстанции нуклеотидно-пептидной природы, программируемая клеточная смерть.

RESEARCH ON THE INFLUENCE OF VARIOUS SUBSTANCES ON CASPASE ACTIVITY (REVIEW)

E. S. Kokareva¹, V. V. Morozov¹, Ya. M. Stanishevskiy^{1*}, M. A. Zhuravleva¹, A. V. Zubkov²

Abstract. The paper presents an overview of the structure and functions of caspase group enzymes. The main stages and ways of development of programmed cell death – apoptosis were demonstrated. The mechanisms of inhibition and activation of caspases and their role in cell apoptosis are demonstrated. The different stages of caspase activation in the body are still insufficiently studied. At present, the structure, properties, key points of the functioning and regulation of caspases in the body have been studied in detail, but at the molecular and cellular levels it is not enough to directly regulate their activity. Modern studies of the effect of artificially created substances of different nature on these enzymes, in turn, open up prospects for further search for methods of their regulation, which in turn would allow using the knowledge gained in the treatment of oncological, autoimmune and neurodegenerative diseases.

Keywords: apoptosis, caspase, nucleotides, nucleotide-peptide substances, programmed cell death.

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

2 – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова), 105064, Россия, г. Москва, Малый Казённый переулок, д. 5а

1 – Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

2 – Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Vaccines and Sera, I. I. Mechnikov's» (FSBSI RIVS I. I. Mechnikov's), 5a, Malyi Kazennyi pereulok, Moscow, 105064, Russia,

* адресат для переписки:
E-mail: stanyar@yandex.ru
Тел.: 8 (499) 936 85 99

ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизмов программированной гибели клеток, является одной из актуальных проблем современной биологии, биохимии, генетики, медицины и ряда смежных дисциплин. Центральной компонентой в механизме осуществления апоптоза является протеолитическая система, состоящая из семейства белков, называемых каспазами. Каспазы обнаружены в большинстве живых организмов, и подразделяются на инициаторные и эффекторные. Эти энзимы участвуют в последовательности процессов, запускаемых в ответ на проапоптотические сигналы, и расщепляют аминокислотные последовательности белков, что приводит, в итоге, к гибели клетки. За последнее десятилетие

многие ключевые моменты функционирования и регуляции каспаз были изучены на молекулярном и клеточном уровнях.

В настоящее время установлены основные механизмы реализации процесса апоптоза в эукариотических клетках, активно ведутся исследования регуляторов и активаторов апоптоза. Интерес учёных связан с возможностью применения знаний о программируемой клеточной смерти при лечении онкологических, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний. В данной работе представлен обзор последних достижений и описание современных представлений о регуляции каспаз в процессе апоптоза.

МЕХАНИЗМ АПОПТОЗА

Апоптоз представляет собой генетически запрограммированную, форму гибели клетки и является необходимым условием нормального существования организма. Назначение апоптоза состоит в поддержании постоянства численности клеток, обеспечении правильного соотношения клеток различных типов и удалении генетически дефектных.

Процесс апоптоза характеризуется особенностями морфологии – ядро и цитоплазма уменьшаются в размерах, конденсируются, фрагментируются, клетка распадается на несколько частей (апоптотические тельца), содержащих элементы ядра [1, 3, 4]. Ядро подвергается разрушению через образование крупных фрагментов с последующей их межнуклеосомной деградацией. Плазматическая мембрана клетки претерпевает ряд изменений, в результате чего апоптотические тельца быстро поглощаются макрофагами [2, 3]. Структурная целостность биологических мембран в ходе апоптоза не нарушается, что препятствует выходу содержимого цитоплазмы во внеклеточную среду и развитие воспаления [1, 2]. Процесс апоптоза, как правило, происходит без макроскопических признаков, структурных и функциональных дефектов ткани и без развития воспаления [2].

Условно весь процесс гибели клеток может быть разделен на две фазы: формирование и проведение апоптотических сигналов и демонтаж клеточных структур [1, 3]. Пути, которыми достигается конечная цель апоптоза – гибель клетки, различны и включают сложное взаимодействие большой группы веществ, центральное место среди которых занимают особые протеазы – каспазы.

В клетках млекопитающих классическая передача сигнала апоптоза осуществляется либо внутренним, либо внешним путем, в зависимости от происхождения «стимулов смерти». Внутренний (митохондриальный) сигнал запускается в ответ на широкий диапазон «стимулов смерти», которые генерируются в самой клетке, таких как онкогенная активация и повреждение ДНК.

Генерация сигнала апоптоза внутри клетки осуществляется митохондриями: в ответ на сигналы апоптоза, несколько белков высвобождаются из внутримембранного пространства митохондрий в цитоплазму. Некоторые из этих белков хорошо охарактеризованы (рисунок 1):

- цитохром с;
- SMAC (второй митохондриальный фактор, активирующий каспазы)/ DIABLO (белок с низким значением изоэлектрической точки непосредственно связывающийся с ингибитором апоптоза IAP);

- AIF (фактор, вызывающий апоптоз);
- EndoG (эндонуклеаза G);
- OMI/HTRA2 (белок A2; белок теплового шока).

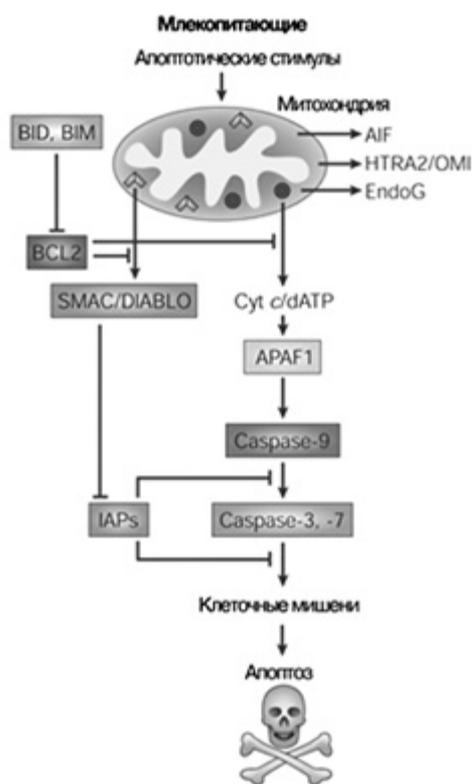


Рисунок 1. Классические пути апоптоза в клетках млекопитающих [6]

Возможно, наиболее интересным из этих проапоптотических белков является цитохром с, который в цитоплазме связывается с белком APAF1 и активирует его [5]. Связывание цитохрома с с APAF1 вызывает такое конформационное изменение, которое позволяет APAF1 связываться с АТФ/дезоксид-АТФ и сформировать апоптосому, которая в свою очередь обеспечивает активацию каспазы-9 [6], таким образом вызывая каскад реакций активации других каспаз.

Внешний путь передачи сигнала апоптоза инициируется связыванием внеклеточного лиганда смерти, а именно –FasL–, с «рецептором смерти», таким как Fas34, на поверхности клетки. «Лиганды смерти» являются конститутивными гомотримерами и, следовательно, связывание их с соответствующими рецепторами приводит к формированию как минимум гомотримерного комплекса лиганд-рецептор, который присоединяет в дальнейшем цитозольные факторы, такие как FADD и каспазы-8, формируя олигомерный индуцирующий смерть сигнальный комплекс (DISC). Формирование DISC приводит к активации иницирующей каспазы (каспаза-8), которая в свою оче-

редь катализирует гидролиз и, как следствие, активацию каспазы-3. Функция DISC в активации каспазы-8 считается аналогичной функции, выполняемой апоптосомой при активации каспазы-9, хотя детальные молекулярные механизмы этих процессов остаются неизвестными. Внешний путь передачи сигнала может пересекаться с внутренним на стадии гидролиза BID (BH3 – единственный представитель семейства BCL2 белков), осуществляемом каспазой-8 [7], что приводит к высвобождению митохондриальных белков и повышению проницаемости наружной мембраны митохондрий.

После инициации процесса апоптоза происходит активация каскада взаимодействий иницирующих и эффекторных каспаз, который заканчивается полной деградацией клетки.

СТРОЕНИЕ И ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ КАСПАЗ

Каспазы – цистеиновые протеазы, которые катализируют гидролиз субстрата после остатка аспартата. Первая каспаза, интерлейкин-1-конвертирующий (превращающий) фермент (ICE; также известный как каспаза-1), был идентифицирован у человека. Ключевая роль каспаз в процессе апоптоза была установлена при изучении клеток нематоды *Caenorhabditis elegans*. В этих клетках ген *ced-3* (cell-death abnormality-3) кодировал цистеиновую протеазу, сходную с каспазой-1 (ICE) из клеток млекопитающих [8]. В настоящее время идентифицированы 14 различных каспаз млекопитающих, из которых 11 присутствуют в клетках человека.

По крайней мере, 7 из 14 известных каспаз млекопитающих играют важную роль в апоптозе [9]. Апто-

тические каспазы обычно подразделяют на два класса: иницирующие каспазы: каспазы -2, -8, -9, -10, и эффекторные каспазы: каспазы-3, -6 и -7 (рисунок 2). Иницирующие каспазы характеризуются продоменным N-концевым участком, включающим один или несколько специальных адапторных участков, важных для ее функционирования, тогда как эффекторные каспазы содержат 20–30 остатков в аминокислотной последовательности продомена.

Положение первого активационного гидролиза внутри цепи (между большой и малой субъединицами, ~p20 и ~p10, соответственно) указано черной стрелкой, тогда как другие места гидролиза показаны серыми стрелками. Полагают, что гидролиз в этих местах модулирует активность каспазы и регуляцию каспаз ингибитором белков апоптоза (IAP) и другими белками. В отличие от других проферментов (зимогенов) протеаз, удаление N-концевого продомена каспазы не является необходимым условием для проявления ее каталитической активности. Продомены иницирующих каспаз неизменно содержат мотивы гомотипичного белок-белкового взаимодействия, такие как домен рекрутирования каспазы (CARD) и домен эффектора смерти (DED). Четыре поверхностных петли (L1-L4), которые формируют каталитическое углубление, обозначены на схеме. Каталитический остаток цистеина (Cys) показан в виде темной линии в начале L2. Субъединицы P20 и p10 формируют номер каспазы.

Активация эффекторных каспаз, таких как каспаза-3, выполняется иницирующими каспазами – каспазой-9, путем гидролиза в месте локализации специфических остатков аспарагиновой кислоты, которые отделяют большую (~p20) и малую (~p10) субъединицы. Субъединицы P20 и p10 тесно связываются друг

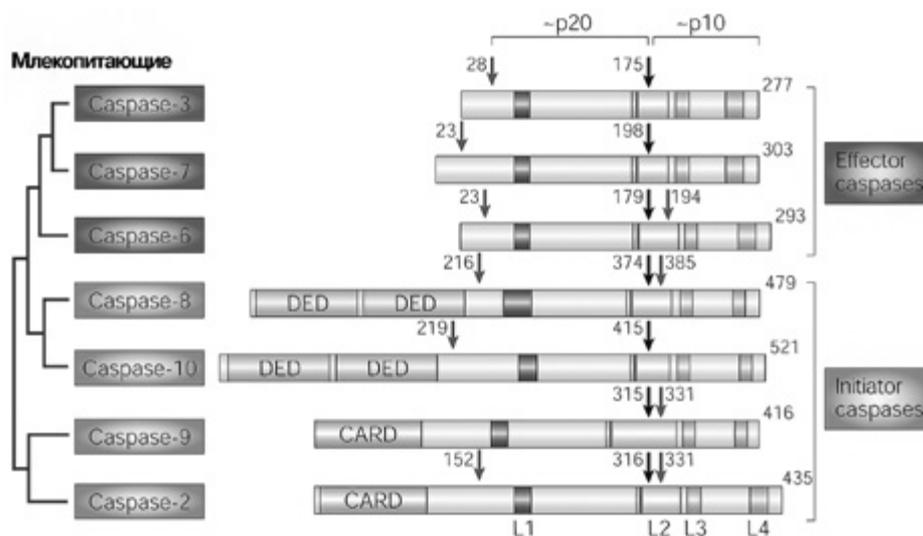


Рисунок 2. Каспазы млекопитающих, участвующие в процессе апоптоза [9]

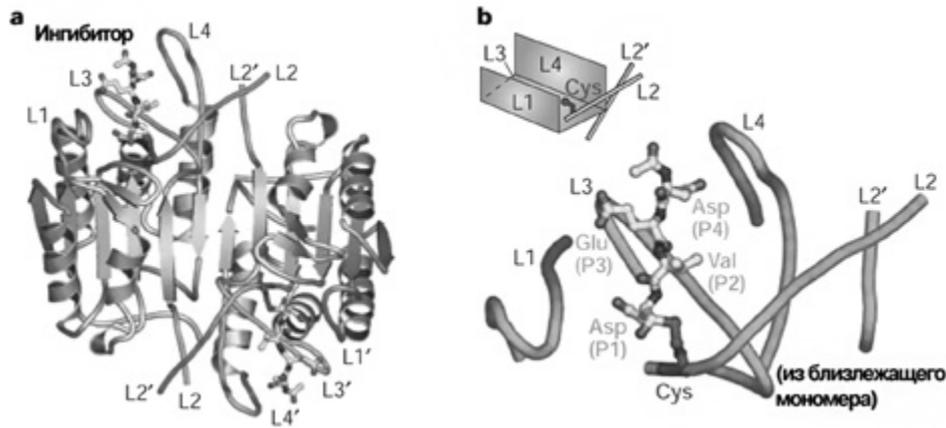


Рисунок 3. Структурные особенности каспаз [10].

а) Структура каспаз на примере каспазы – 7; б) Активный центр каспаз

с другом, формируя мономер каспазы. Иницирующие каспазы, наоборот, аутоактивируются. Поскольку активация иницирующих каспаз неизбежно запускает каскад реакций активации других каспаз в клетках, этот процесс тщательно регулируется и часто требует сборки многокомпонентного комплекса в условиях апоптоза.

Для каспаз-1, -2, -3, -7, -8, -9 [53] млекопитающих были получены данные о пространственной структуре. Указанные каспазы были кристаллизованы в виде гомодимеров (рисунок 3а). Основная структура мономера каспазы консервативна и включает большую (~20 kDa) и малую (~10 kDa) субъединицы. Гомодимеризация обеспечивается гидрофобными взаимодействиями, в которых принимают участие по шесть β -нитей от каждого мономера, формирующие единый непрерывный 12-нитевой β -лист (рисунок 3а). Несколько α -спиралей и коротких β -нитей расположены по обе стороны от центрального β -листа, который дает начало фолдингу глобулы. Активные центры, сформированные четырьмя выступающими из структурного

скелета петлями (L1-L4), расположены в двух противоположных концах β -листа (рисунок 3а).

Исследование таких структур показало, что базовая конфигурация активного центра имеет высококонсервативное строение для всех изученных каспаз (рисунок 3б). Сохранение конформации активного центра одного мономера обеспечивается L2' петлей соседнего мономера. Такая структура является ключевым элементом сохранения функциональной активности каспаз (рисунок 3).

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КАСПАЗ

Каспазы синтезируются в виде профермента (зимогена), содержащего одну полипептидную цепь. Эффекторные каспазы существуют конститутивно в виде гомодимера. Механизм активации эффекторных каспаз установлен на примере каспазы-7 и представляет собой последовательные изменения конформации активного центра после активационного гидролиза (рисунок 4а).

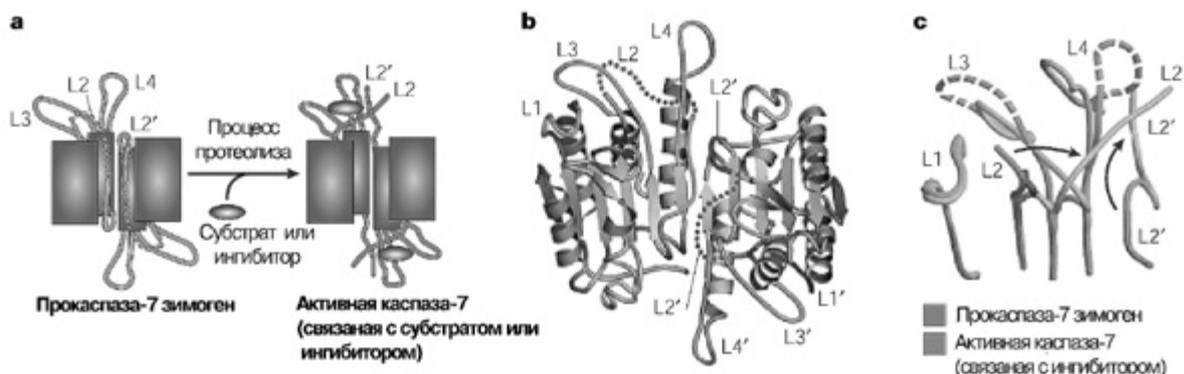


Рисунок 4. Молекулярный механизм активации прокаспазы-7 [10].

а) Схема процесса активации прокаспазы-7; б) Структура профермента прокаспазы-7

Сравнение неактивной структуры и структуры комплекса активной каспазы-7 с ингибитором (рисунок 4а) показывает стабильность структуры ядра (базовой части) прокаспазы-7 (зимогена). Однако петли, формирующие активный центр, изменяют конформационные изменения после гидролиза. Петля L2 искривляется, сдвигая каталитически активный цистеин в неоптимальное для катализа положение (рисунок 4с). Поражающим фактом является изменение конформации, а именно поворот почти на 180° петли L2', которая обеспечивает сохранение конформации активного центра соседнего мономера каспазы. Кроме того, L3 и L4 становятся очень гибкими (рисунок 4с). Эти конформационные перегруппировки в зимогене каспазы-7 предотвращают формирование субстрат-связывающего кармана. Таким образом, полученные данные объясняют, почему прокаспазы-7 (зимоген) не обладает каталитической активностью.

Гидролитическое расщепление цепи позволяет петлям L2' и L2 принять открытую конформацию, которую можно наблюдать в структуре комплекса каспазы-7 с ингибитором (рисунок 4а). Поскольку механизм взаимодействия между петлями L2', L2 и L4 высококонсервативен, его можно считать общим для всех каспаз. Эта гипотеза была подтверждена для каспаз-3 и -6.

ИНГИБИТОРЫ КАСПАЗ

Синтез каспаз подчиняется транскрипционной регуляции и пост-трансляционной модификации. Кроме того, представители консервативного семейства IAP белков могут потенциально ин-

гибировать ферментативную активность каспаз и постоянно удалять каспазы через метаболический путь – убиквитин-протеосома[11].

Известны следующие IAP белки млекопитающих:

- XIAP (X-linked IAP);
- c-IAP1, c-IAP2;
- ML-IAP (IAP меланомы)/Livin;
- ILP2 (IAP-подобный белок-2);
- NAIP (белок-ингибитор апоптоза нейронов);
- Bruce/Apollon и сурвивин.

В клетках млекопитающих, каспазы-3, -7 и -9 ингибируются белками IAP (рисунки 2, 5). Интересно, что каспаза-9, прежде всего, ингибируется XIAP, хотя она связывается с несколькими IAP. В отличие от этого, каспаза-3 и-7 ингибируются XIAP и, в меньшей степени, c-IAP1, c-IAP2 и NAIP [12].

Признаком IAP белков является наличие повторяющегося домена бакуловирусного IAP (BIR), представляющего собой ~80 аминокислотный цинк связывающий домен. XIAP, c-IAP1 и c-IAP2 содержат три BIR домена каждый, при этом различные BIR домены имеют различные функции (рисунок 5). Сурвивин [13], содержащий единственный BIR домен, не ингибирует активность каспазы *in vitro*.

Молекулярный механизм ингибирования IAP белками эффекторных каспаз установлен путем анализа кристаллических структур каспазы-3 и каспазы-7 связанных с ингибиторным фрагментом XIAP. В этих струк-

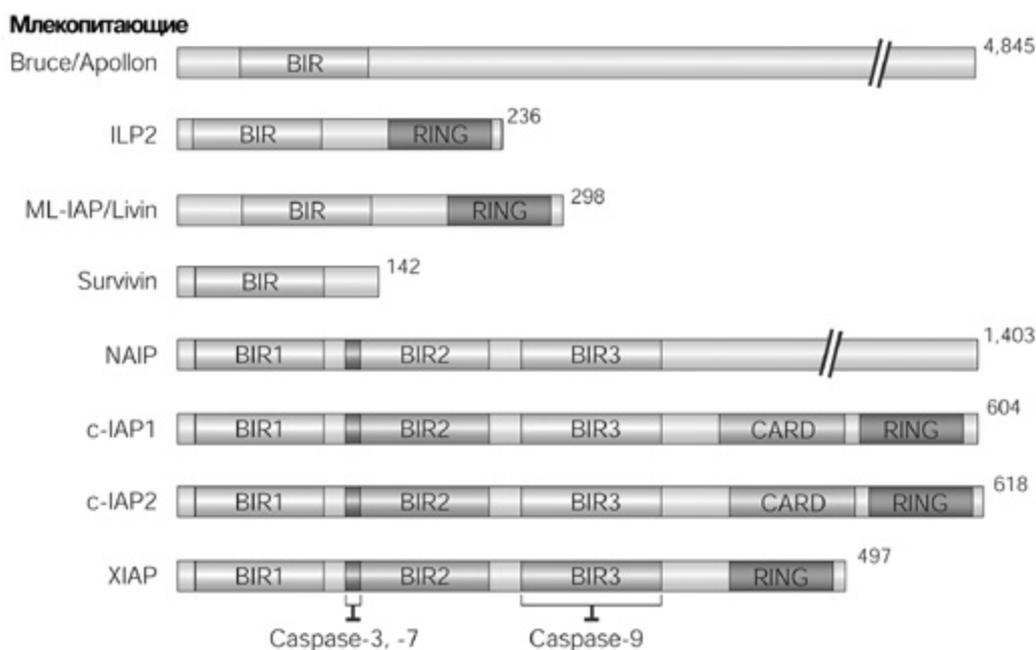


Рисунок 5. IAP белки [12]

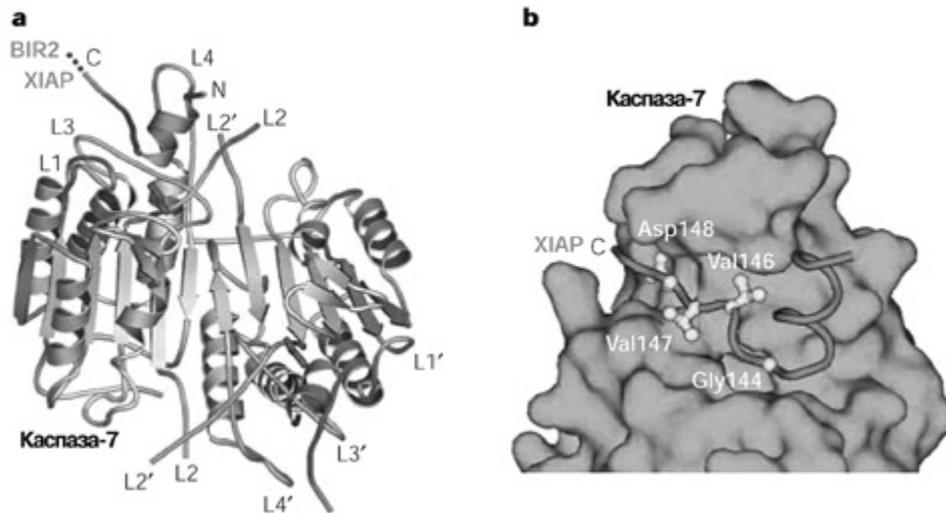


Рисунок 6. Молекулярный механизм IAP опосредованного ингибирования эффекторных каспаз [12].

а) Кристаллическая структура каспазы-7; б) Крупным планом представлен активный центр каспазы-7 со связанным фрагментом XIAP

турах, короткий линкерный пептид, предшествующий BIR2 домену в XIAP, формирует идентичные взаимодействия с каспазой-3 или -7 (рисунок 6а). По сравнению с ковалентными пептидными ингибиторами, линкерный пептид молекулы XIAP обратно-ориентированно блокирует активный центр каспазы-3 или -7 закрывая места входа субстрата (рисунок 6б).

Линкерный пептид, расположенный перед доменом BIR2 в XIAP, играет важную роль в ингибировании каспазы-3 или -7. Рекombинантный белок с линкерным пептидом соединенным или с N-или с C-концом BIR1 был способен связываться и ингибировать каспазу-3, тогда как ни BIR1, ни BIR2 в гомогенном состоянии не ингибировали фермент.

Активированная каспаза-9 может ингибироваться BIR3 доменом XIAP. Мутационный анализ идентифицировал три остатка в молекуле XIAP – Trp310, Glu314 и His343 – которые являются обязательными для XIAP-опосредованного ингибирования каспазы-9 [12].

Этот перехваченный мономер каспазы-9 имеет каталитически неактивную конформацию активного центра. Так, XIAP ингибирует каспазу-9, «поддерживая» ее в мономерном состоянии, которое предотвращает проявление каталитической активности.

В отличие от XIAP, для которого мишенями являются каспазы-3, -7 и -9 млекопитающих, белок бакуловируса p35 является эффективным ингибитором большинства каспаз и *in vivo* и *in vitro*. Ингибирование каспазы белком p35 коррелирует с гидролизом после остатка Asp87 в полипептидной цепи, образующей петлю в активном центре, и последующим формированием комплекса протеазы с ковалентно связанным ингибитором. Аналогичный принцип действия установлен для другого бакуловирусного белка – p49. Кроме того, серпин (ингибитор сериновых протеаз) CrmA, выделенный из вируса коровьей оспы, также ингибирует активность ряда каспаз, нарушая структуру их активного центра, вероятно по

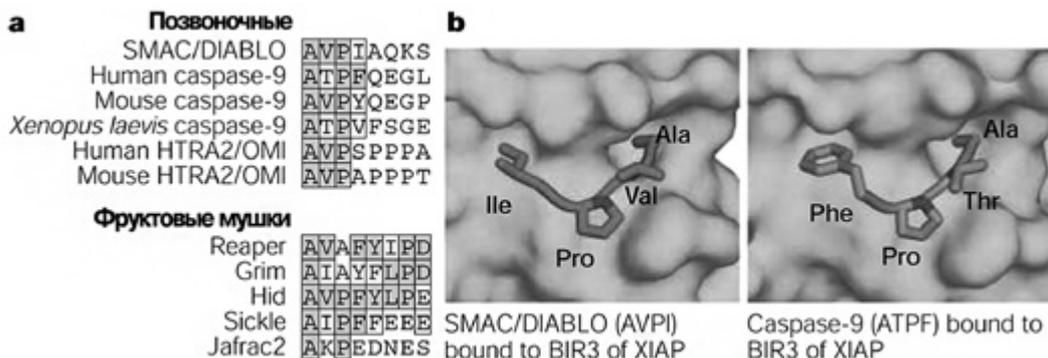


Рисунок 7. SMAC/DIABLO-опосредованное снятие ингибирования каспазы-9 белком XIAP [17]

тому же механизму, который был установлен для процесса ингибирования серпином активности сериновых протеиназ.

СНЯТИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ КАСПАЗ

В процессе апоптоза по IAP-опосредованному ингибированию каспаз противодействует семейство белков, которые содержат тетрапептидный мотив, обеспечивающий связывание IAP [15] (рисунок 7а). У млекопитающих это митохондриальный белок SMAC/DIABLO. Благодаря направленному расщеплению митохондриальной последовательности, зрелый белок SMAC/DIABLO содержит в N-концевой последовательности тетрапептид – Ala-Val-Pro-Ile – который связывается с консервативным углублением на поверхности BIR3 домена XIAPa [16]. Другой митохондриальный белок, HTRA2/OMI, также содержит связывающий IAP тетрапептид в N-концевой последовательности (рисунок 7а) и может в высоких концентрациях противодействовать XIAP-опосредованному ингибированию каспазы-9 [16].

Участок связывания этого консервативного тетрапептида находится на поверхности доменов BIR2 и BIR3 в XIAP (93,94), с-IAP1 и с-IAP2. (рисунок 7б). Мутационная замена Ala на любую другую аминокислоту, например метионин (Met) или глицин (Gly), приводит к блокированию взаимодействий с BIR доменами. В последовательности трех других аминокислот тетрапептида возможны замены, однако наличие пролина третьем положении и гидрофобного остатка с большими геометрическими размерами в четвертом положении является обязательным (рисунок 7а).

Тетрапептид SMAC/DIABLO способен удалять XIAP-опосредованное ингибирование каспазы-9, но не снимает IAP- ингибирование каспаз. Причины очевидны – участок связывания тетрапептида находится на поверхности BIR2 или BIR3 домена XIAP (или с-IAP1 или с-IAP2), а участок его связывания при ингибировании каспазы-3 или-7 расположен между BIR1 и BIR2 доменами XIAP (или с-IAP1 или с-IAP2). Важно, что для SMAC/DIABLO-опосредованного снятия ингибирования каспазы-7 необходимо связывание и с BIR2 и с BIR3 доменами [17]. Согласно этой модели, связывание с BIR доменами обязательно не только для N-терминального тетрапептида SMAC/DIABLO, но и для обширного поверхностного участка, который доступен только в димерном SMAC/DIABLO из «дикого типа». Эта модель подтверждается данными о слабом взаимодействии мономерных мутантов SMAC/DIABLO с BIR2 доменом и их неспособностью снимать IAP-опосредованное ингибирование каспазы-3.

АКТИВАЦИЯ КАСПАЗ

В отличие от эффекторных каспаз, у которых и проферменты (зимогены) и активированные ферменты существуют в виде гомодимера, ситуация с формами существования иницирующих каспаз оказалась значительно сложнее. Каспаза-9 и до и после протеолиза в основном существует в виде мономера. В отличие от нее каспаза-8 согласно литературным данным существует в виде мономеров и димеров в равновесном состоянии [18]. Существование каспазы-9 в форме мономером позволяет предсказать, что ее активный центр находится в конформации неоптимальной для катализа из-за отсутствия формирующей активный центр L2> петли. Восстановление оптимальной для катализа конформации активного центра является важным для активации каспазы-9. В клетках этот процесс активации происходит в результате образования комплекса каспазы-9 и апоптосомы и сопровождается увеличением ее в активности в 2000 раз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время отдельные механизмы активации каспаз в организме остаются малоисследованы. Подробно изучены строение, свойства, ключевые моменты функционирования и регуляции каспаз в организме, но недостаточно сведений о непосредственной регуляции их активности.

Современные исследования влияния искусственно созданных субстанций различной природы на ферменты семейства каспаз открывают перспективы для дальнейшего поиска методов их регуляции активности ферментов семейства каспаз, что позволит разработать новые методы лечения пациентов с онкологическими, аутоиммунными и нейродегенеративными патологиями.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ по Программе реализации комплексных проектов по созданию высокотехнологичного производства (Постановление Правительства РФ № 218 от 09.04.2010 г. шифр конкурса 2016-218-09). Договор № 03.G25.310258.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирская Е. Б. Механизмы апоптотической смерти клеток. Гематология и трансфузиология. 2002. Т. 47. № 2. С. 35–40. [Vladimirskaia E. B. Mehanizmy apoptoticheskoi smerti kletok. Gematologija i transfuziologija. [Mechanisms of apoptotic cell death. Hematology and transfusiology.] 2002. T. 47. № 2. P. 35–40.]
2. Григорьев М. Ю., Имянитов Е. Н., Хансон К. П. Апоптоз в норме и патологии. Медицинский академический журнал. 2003. Т. 3. № 3. С. 3–11. [Grigor'ev M. Ju., Imjanitov E. N., Hanson K. P. Apoptoz v norme i patologii. Medicinskij akademicheskij zhurnal. 2003. [Apoptosis is normal and pathological. Medical Academic Journal.] T. 3. № 3. P. 3–11.]
3. Нагорнев В. А., Восканьянц А. Н. Апоптоз и его роль в атерогенезе. Медицинский академический журнал. 2003. Т. 3. № 4. С. 3–18.

- [Nagornev V. A., Voskan'janc A. N. Apoptoz i ego rol' v aterogeneze. Medicinskij akademicheskij zhurnal. [Apoptosis and its role in atherogenesis. Medical Academic Journal.] 2003. T. 3. № 4. P. 3–18.]
4. Робинсон М. В., Труфакин В. А. Апоптоз клеток иммунной системы. Успехи современной биологии. 1991. Т. 3. Вып. 2. С. 246–259. [Robinson M. V., Trufakin V. A. Apoptoz kletok immunnoj sistemy. Uspehi sovremennoj biologii. [Apoptosis of cells of the immune system. Successes of modern biology.] 1991. T. 3. Vyp. 2. P. 246–259.]
 5. Rodriguez J., Lazebnik Y. Caspase-9 and Apaf-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 1999. № 13. P. 3179–3184.
 6. Saleh A., Srinivasula S. M., Acharya S., Fishel R., Alnemri E. S. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 17941–17945.
 7. Yang X., Chang H. Y., Baltimore D. Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science.* 1998. V. 281. P. 1355–1357.
 8. Kumar S., Doumanis J. The fly caspases. *Cell Death Differ.* 2000. № 7. P. 1039–1044.
 9. Shi Y. Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure.* 2002. № 10. P. 285–288.
 10. Wei Y. The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity. *Chem. Biol.* 2000. № 7. P. 423–432.
 11. Salvesen G. S., Duckett C. S. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. № 3. P. 401–410.
 12. Sun C. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature.* 1999. V. 401. P. 818–822.
 13. Ashhab Y., Alian A., Polliack A. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Lett.* 2001. V. 495. P. 56–60.
 14. Zoog S. J., Schiller J. J., Wetter J. A. Baculovirus apoptotic suppressor P49 is a substrate inhibitor of initiator caspases resistant to P35 in vivo. *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 5130–5140.
 15. Srinivasula S. M. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO mediates opposing effects on caspase activity and apoptosis. *Nature.* 2001. V. 409. P. 112–116.
 16. Shi Y. A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding. *Cell Death Differ.* 2002. № 9. P. 93–95.
 17. Wu G. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature.* 2000. V. 408. P. 1008–1012.
 18. Yang X., Chang H. Y., Baltimore D. Autoproteolytic activation of procaspases by oligomerization. *Mol. Cell.* 1998. № 1. P. 319–325.
 19. Boatright K. M., Salvesen G. S. Mechanisms of caspase activation. *Boatright, Curr. Opin. Cell Biol.* 2003. № 15. P. 725–731.
 20. Olivera S.-C. M., Caballero B. M., Argent R., Alonso J. C., Centeno F., Lorenzo M. J. JNK signaling pathway regulates sorbitol-induced Tau proteolysis and apoptosis in SH-SY5Y cells by targeting caspase-3. *Arch Biochem Biophys.* 2017. № 15. V. 636. P. 42–49.
 21. Lou M., Zhang L. N., Ji P. G., Feng F. Q., Liu J. H., Yang C., Li B. F., Wang L. Quercetin nanoparticles induced autophagy and apoptosis through AKT/ERK/Caspase-3 signaling pathway in human neuroglioma cells: *In vitro* and *in vivo*. *Biomed Pharmacother.* 2016. V. 84. P. 1–9.
 22. Liu R., Shih T.-C., Deng X., Anwar L., Ahadi S., Kumaresan P., Lam K. S. Design, Synthesis, and Application of OB2C Combinatorial Peptide and Peptidomimetic Libraries, *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1248. P. 3–22.
 23. Allaman-Pillet N., Oberson A., Schorderet D. F., BIR01, a Cell-Permeable BH3 Peptide, Promotes Mitochondrial Fragmentation and Death of Retinoblastoma Cells, *Mol. Cancer Res.* 2015. V. 13. №1. P. 86–97.
 24. Russo P., Arzani D., Trombino S., Falugi C. C-myc Down-Regulation Induces Apoptosis in Human Cancer Cell Lines Exposed to RPR-115135 (C31H29NO4), a Non-Peptidomimetic Farnesyltransferase Inhibitor, *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2003. V. 304. P. 37–47.

УДК 615.1; 615.2; 615.4

СОЗДАНИЕ И ФАРМАКОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ МЕКСИДОЛА

Э. Ф. Степанова^{1*}, С. О. Лосенкова², Ю. А. Морозов³

Резюме. Настоящее исследование посвящено созданию и изучению трансдермальных лекарственных форм с мексидолом и экспериментальному обоснованию их терапевтической эффективности. Предложены оригинальные технологические схемы трансдермальных пластырей с мексидолом. Выбрана рациональная упаковка, установлен срок годности лекарственной формы. Разработан, обоснован, подтвержден биофармацевтическими исследованиями оптимальный состав пластырной массы. Проведена стандартизация пластыря по наиболее характерным и значимым показателям. Изучено местнораздражающее действие и гиперчувствительность предложенной лекарственной формы. Исследована и подтверждена способность трансдермальной формы мексидола к чрескожному транспорту.

Ключевые слова: мексидол, трансдермальный пластырь, чрескожный транспорт, биофармацевтические исследования *in vitro*, вспомогательные вещества.

CREATION AND PHARMACOTECHNOLOGICAL INVESTIGATIONS OF INNOVATIVE DOSAGE FORMS OF MEXIDOL

E. F. Stepanova^{*}, S. O. Losenkova², Yu. A. Morozov³

Abstract. The present study is devoted to the creation and study of transdermal dosage forms with mexidol and experimental substantiation of their therapeutic efficacy. The original technological scheme of production of one of the most popular structures transdermal – transdermal patches with mexidol. Selected efficient packaging, a shelf life of dosage forms. Developed, justified, biopharmaceutical research confirmed the optimal composition cohesive mass. Conducted optimal standardization of patches according to the most characteristic and important indicators. Studied local irritating effect and hypersensitivity proposed dosage form. Investigated and confirmed the ability of transdermal forms of mexidol to percutaneous transport.

Keywords: mexidol, transdermal patches, percutaneous transport, biopharmaceutical studies *in vitro*, excipients.

1 – Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр-т Калинина, д. 11

2 – ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 214019, Россия, г. Смоленск, ул. Крупской, д. 28

3 – ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени Коста Левановича Хетагурова», 362025, Россия, г. Владикавказ, ул. Ватутина, д. 44–46

1 – Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of Volgograd State Medical University of the Ministry of Healthcare, 11, Kalinina av., Stavropol region, Pyatigorsk, 357532, Russia

2 – Smolensk State Medical University of the Ministry of Healthcare, 28, Krupskaya str., Smolensk, 214019, Russia

3 – North Ossetian State University named after Kosta Levanovich Khetagurov, 44–46, Vatutina str., Vladikavkaz, 362025, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: efstepanova@yandex.ru

Тел.: 8 (8793) 39 19 37

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время существует ряд приоритетных направлений инновационных технологий в фармации, одним из которых является создание новых лекарственных форм (ЛФ) с улучшенными фармакокинетическими свойствами, которые за счет поддержания постоянной концентрации активного вещества в крови позволяют уменьшить кратность приема лекарственного средства (ЛС). Трансдермальные терапевтические системы (ТТС) относятся к инновационным ЛФ с модифицированным высвобождением по принципу регулирования [1–3].

Мексидол (этилметилгидроксипиридина сукцинат) – отечественный препарат из группы антигипоксантов и антиоксидантов. Оказывает также мембраностабилизирующее, анксиолитическое действие. Повышает резистентность организма к воздействию разных

повреждающих факторов. Улучшает и стабилизирует мозговой метаболизм и кровоснабжение головного мозга, то есть имеет широкий диапазон и минимум побочных эффектов. Мексидол присутствует на фармацевтическом рынке уже 20 лет и отличается высокой способностью к импортозамещению. Однако ассортимент ЛФ мексидола пока ограничен, в то время как его расширение позволит еще больше повысить интерес к этому перспективному ЛС и обеспечить его дальнейшее надежное будущее [4, 5].

Следует отметить, что на сегодняшний день разработки в области ТТС не ограничиваются выбором в качестве действующих компонентов только синтетических ЛС [6].

Так, Е. А. Мориной разработаны составы и предложена технология получения ТТС на основе флаволигнанов плодов расторопши пятнистой: силимарина

(суммы флаволигнанов: силибина, силидианина, силикристина), силикристина и их липосомных форм [7, 8]; П.Г. Мизиной теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены технология и составы пролонгированных аппликационных ЛФ на основе растительных фенилпропаноидов [9]; Ю.А. Морозовым с соавторами всесторонне экспериментально (*in vitro* и *in vivo*) изучена способность лигнанов (схизандрин и γ -схизандрин) лимонника китайского к чрескожной проницаемости и доказана фармакологическая активность разработанной трансдермальной мази на основе суммарного фитопрепарата лимонника китайского семян [10, 11].

Поэтому целью настоящего исследования является разработка инновационных ЛФ мексидола. Тем более что разработка трансдермальных пластырей с мексидолом, их исследование и доказательства возможности чрескожного транспорта – позиции совершенно оригинальные.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служила фармацевтическая субстанция (ФС) мексидола (субстанция-порошок, отвечающая требованиям ФС.2.1.0046.15, ООО «Бион», Россия) и вспомогательные вещества (ВВ) различной направленности действия:

- пластификаторы: полиэтиленоксид-400 (ПЭО-400) (Acros Organics, Бельгия), пропиленгликоль-1,2 (ПГ-1,2) (EP/USP, DOW Europe GmbH, Германия);
- пролонгаторы: поливинилпирролидон (ПВП) среднемолекулярный (коллидон-30, Cas № 9003-39-08, Ph. Eur., USP/NF и JP/JPE, BASF, Германия), поливинилпирролидон высокомолекулярный (коллидон-90F, Cas № 9003-39-08, Ph. Eur., USP/NF и JP, BASF, Германия);
- пенетраторы: диметилсульфоксид (ДМСО) (Cas № 67-68-5, Fengchen Group Co., Ltd., China);
- эмульгаторы: твин-80 (Cas № 9005-65-6, KOLB, Швейцария);
- консерванты: спирт этиловый 95% (ФС.2.1.0036.15, ЛС-002430, ООО «Константа-Фарм М», Россия).

Для проведения анализов использовались следующие реактивы: вода очищенная (ФС.2.2.0020.15), кислота хлористоводородная (х.ч., «Сигма Тек», Россия).

В работе использованы технологические, биофармацевтические (*in vitro*), физико-химические методы исследований. Методически подробно охарактеризован фармакологический фрагмент: изучение раздражающего действия и оценка некоторых гистологических параметров.

Диализ проводили в термостате при температуре 37 °С, в качестве диализной среды использовали воду очищенную. Отбор проб диализата осуществляли через 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48, 72 часа от начала эксперимента. Отобранный объем (3 мл) возмещали чистым растворителем. Анализ разведения диализата осу-

ществляли УФ-спектрофотометрически в диапазоне волн 240–340 нм в среде 0,01 М кислоты хлористоводородной. При увеличении содержания ФС в пластырях увеличивали соответственно и объем диализной среды [12, 13].

В качестве основных исследуемых параметров выбраны скорость трансдермальной подачи ФС из ЛФ в диализную среду (мкг/ч·см²), степень высвобождения (%), коэффициент использования (%) ФС из матрицы, длительность плато пролонгации (ч).

Показатель качества трансдермального пластыря «сопротивление отслаиванию» исследовали на разрывной машине РМИ-5 при двух скоростях отрыва: 50 и 100 мм/мин. В качестве препаратов сравнения использовали перцовый пластырь («Верофарм», Россия) и трансдермальный пластырь «Никоретте» («МакНил», Швеция). За результат сопротивления отслаиванию принимали среднеарифметическую величину 5 испытаний.

Для идентификации этилметилгидроксипиридина сукцината в составе ТТС ее пластырную массу растворяли в 3,0 мл воды очищенной, прибавляли 0,1 мл концентрированного раствора аммиака и 5 мл эфира диэтилового (трехкратно 2:2:1 мл), после разделения эфирные экстракты объединяли. Системой растворителей служила смесь ацетона : этилацетата : аммиака раствора концентрированного (5:5:0,5). Полученную хроматограмму высушивали на воздухе и просматривали в УФ-свете с помощью УФ-лампы.

При проведении теста «Растворение» в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ОФС.1.4.2.0017.15 «Растворение для трансдермальных пластырей») использован аппарат 2 «Лопастная мешалка» (тестер растворимости ERWEKA DT 700). В качестве среды растворения использовали воду очищенную (объем 600 мл; pH 5,826±0,312). Температура среды растворения 37±0,5 °С, скорость вращения лопасти мешалки 50 об/мин. Параллельно проводили контрольный опыт, исследуя пластырь без ФС. Количественное содержание мексидола в отобранных пробах определяли также УФ-спектрофотометрическим методом в диапазоне волн 240–340 нм.

Определение проницаемости кожи трансдермального мексидола *in vivo* осуществляли на лоскутах кожи, связанных двумя концами с животным. Внутривенно крысам (массой 180–220 г, n=7) вводили раствор хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг массы тела животного. На участке кожи спины крысы тщательно удаляли шерсть, делали два разреза длиной 10 см, расстояние между которыми составляло 4–5 см; между разрезами кожу отделяли от подлежащих тканей. Под лоскут кожи, связанный с животным двумя концами, помещали небольшой резервуар, заполненный водой очищенной (объем 10 мл).

Поверхность кожи (эпидермиса) смачивали водой, вытирая насухо. Вода является простейшим ускорителем всасывания, так как при гидратации кожи липидная бислоиная структура её «разрыхляется», ткань



Тестер растворения ERWEKA DT 720

набухает, ослабляются связи между молекулами, что влечёт за собой более мягкую миграцию ФС через кожу.

Далее накладывали пластырь площадью 2 см² (4 мг ФС). Параллельно проводили контрольный опыт, для чего на кожу наносили пластырь без ФС площадью 2 см². Водный раствор, омывавший гиподермальную поверхность кожи, на эпидермис которой наносили испытуемый пластырь, исследовали методом УФ-спектрофотометрии в диапазоне волн 240–340 нм.

С целью количественной оценки степени высвобождения и чрескожного проникновения мексидола пластырь наносился на предварительно очищенную от шерсти и гидратированную кожу крыс-самцов (n=7) площадью 5 см² (содержание ФС 10 мг) на трое суток эксперимента. По истечении времени наблюдения осуществляли смыв с поверхности кожи 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной и готовили разведение, которое анализировали спектрофотометрически в диапазоне волн 240–340 нм, в качестве раствора сравнения использовали 0,01 М раствор кислоты хлористоводородной. Аналогично проводили контрольный опыт, накладывая на кожу пластырь, не содержащий ФС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве предварительного этапа и с целью терапевтического обоснования конструирования состава пластырной массы и анализа взаимного влияния компонентов ЛФ на первом этапе исследования были вычислены основные молекулярные дескрипторы, главными из которых являются потенциал ионизации с учётом гидратации, сродство к электрону, поляризуемость, дипольный момент в газовой фазе, коэффициент распределения в системе «октанол – вода». Исследование проведено на базе Пяти-

горского медико-фармацевтического института совместно с профессором А.В. Погребняком (таблица 1). Методика и результаты проведенного исследования более подробно приведены в работе [14].

Близость физико-химических дескрипторов обеспечивает взаимную химическую инерцию, с одной стороны, и достаточное адсорбционное взаимодействие – с другой. Для последующего разделения ФС и ВВ на кластеры исходные данные всех компонентов были сгруппированы и перенесены в статистическую программу, где с ними произведена стандартная процедура разделения на кластеры методом k-среднего. Результаты разделения представлены в таблице 2.

Таблица 1.

Расчёт основных физико-химических дескрипторов молекул этилметилгидроксипиридина сукцината и ВВ

ФС и ВВ	Дескрипторы					
	Поляризуемость, А ³	Коэффициент распределения logP	Энергия гидратации, ккал/моль	НСМО, эВ	ВЗМО, эВ	Дипольный момент Д
Мексидол	15,87	0,55	-4,89	+0,007	-9,153	2,49
ПЭО-400	18,64	-1,2	-16,08	+2,030	-10,610	1,68
ПВП	37,63	-0,55	1,59	+0,980	-9,370	6,51
ДМСО	5,01	-0,68	-1,36	+0,260	-9,350	4,49
Твин-80	63,15	2,43	-18,40	+1,020	-9,820	5,28
ПГ-1,2	7,55	-0,30	-10,81	+2,970	-11,020	2,11

Таблица 2.

Сводная таблица разделения ФС и ВВ на кластеры

ФС и ВВ	VARIABLE	CLUSTER	DISTANCE
Мексидол	1	1	2,20
ПЭО-400	3	3	2,04
ПВП	4	1	7,56
ДМСО	5	1	5,92
Твин-80	6	2	0,00
ПГ-1,2	7	1	6,01

В одинаковые группы (кластеры) со сходными физико-химическими дескрипторами совместно с этилметилгидроксипиридина сукцинатом вошли ПВП, ДМСО, ПГ-1,2.

На основании литературных данных и результатов кластерного анализа были сконструированы и изучены 6 модельных образцов трансдермальных пластырей с этилметилгидроксипиридина сукцинатом, составы которых приведены в таблице 3.

Сконструированные трансдермальные пластыри с целью сравнительной оценки влияния ВВ на степень и скорость высвобождения ФС из ЛФ были подвергнуты биофармацевтическим исследованиям методом диализа *in vitro* с использованием модели биологической мембраны, моделирующей кожные покровы.

Таблица 3.

Составы исследуемых матриц трансдермального пластыря с мексидолом (на 500 см², г)

Компоненты		1	2	3	4	5	6
ФС	Мексидол	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Пластификаторы	ПЭО-400	6,07	6,07	–	–	3,47	3,47
	ПГ-1,2	–	–	4,50	4,50	2,25	2,25
Пролонгаторы	ПВП-30F	8,00	–	8,00	–	8,00	–
	ПВП-90F	–	4,40	–	4,40	–	4,40
Растворитель, консервант	Спирт этиловый 95%	18,00	26,00	18,00	26,00	18,00	26,00

С учётом фонового влияния ВВ, входящих в состав матрицы, параллельно проводили контрольные опыты, где в качестве объекта исследования использовали пластыри без ФС.

Оптимальный состав трансдермального пластыря с этилметилгидроксипиридина сукцинатом, выбранный после экспериментальных исследований, представлен в таблице 4.

Таблица 4.

Состав ТТС с мексидолом (площадь 25 см², г)

Компоненты ТТС	Матрица № 4
Этилметилгидроксипиридина сукцинат	0,050
ПВП-90F	0,22
ПГ-1,2	0,225
Спирт этиловый 95%	1,300

В связи с тем, что скорость трансдермальной подачи ФС из ТТС должна определяться концентрацией ФС в диффузионной матрице, на дальнейшем этапе наших исследований проведено сравнительное изучение основных параметров ТТС с учетом различного содержания в них мексидола. Результаты биофармацевтического исследования указывают на то, что скорость трансдермальной подачи этилметилгидроксипиридина сукцината из оптимального состава при увеличении его содержания в матрице возрастает. Прямая пропорциональная зависимость скорости трансдермальной подачи от содержания этилметилгидроксипиридина сукцината в матрице сохраняется до достижения величины его содержания 0,2 г в 25 см², при дальнейшем увеличении концентрации ФС в ТТС скорость трансдермальной подачи изменяется непропорционально.

Проведенные долгосрочные испытания стабильности пластырей с мексидолом позволили определить составы и выбрать материал для ламинирования: пленка-подложка (пленка полиэтилен-терафталатная металлизированная толщиной 20 мкм по ТУ 6-19-611-86 марки «Н») и защитное покрытие (пленка полиэтилен-терафталатная с силиконизированным бумажным покрытием по ТУ ОП 13-0281020-15-91 или светонепроницаемая алюминиевая фольга).

Кроме того, было показано, что пластыри в рамках проведенных исследований стабильны в течение двух лет хранения.

В процессе производства ТТС традиционной является разработка норм качества для их стандартизации. Оптимальные реологические характеристики пластырных масс обеспечивают однородность массы, а следовательно, достижение равномерности распределения ее на пленке-подложке, сцепление с пленкой-подложкой.

Динамическая вязкость сконструированной пластырной массы с этилметилгидроксипиридина сукцинатом определяли с использованием ротационного вискозиметра «Реотест-2» (ГОСТ 1929-51/10); данный показатель находится в интервале от 4,85 до 5,93 Па·с. Полученные результаты позволяют доказать, что пластырная масса с мексидолом по своим структурно-механическим свойствам соответствует требованиям [15], что согласуется с данными литературы.

Одним из самых важных свойств для трансдермальных пластырей и защитных мазей является адгезия, так как в случае отклеивания или сползания с места аппликации терапевтический эффект ЛС снижается или полностью исчезает. Результаты эксперимента по изучению сопротивления отслаиванию трансдермального пластыря с мексидолом приведены в таблице 5.

Таблица 5.

Значения показателей «сопротивление отслаиванию» для пластырей при разных скоростях отрыва

Исследуемые пластыри / Сопротивление отслаиванию при двух скоростях отрыва	Пластырь «Никоретте»	Перцовый пластырь	ТТС с этилметилгидроксипиридина сукцинатом
$R_{0,50} / R_{0,100}$, Н/см	1,44/1,56	1,14/1,26	1,66/1,74
Относительная погрешность метода (e), %	±4,72/±4,36	±5,97/±5,40	±4,10/±3,91

Значения сопротивления отслаиванию исследуемых пластырей при двух скоростях отрыва достоверно отличаются друг от друга, при этом исследуемый показатель укладывается в оптимальный интервал значений сопротивления отслаиванию 0,35–1,75 Н/см, согласно данным литературы [16].

Количество пластырной массы с этилметилгидроксипиридина сукцинатом на 1 м² составляет 186,0±2,30 г. Потеря в массе при высушивании пластырной массы с этилметилгидроксипиридина сукцинатом составляет 13,08±1,24%, что укладывается в оптимальный интервал значений 6–15% для трансдермальных пластырей типа «перкутены» [17].

При исследовании подлинности этилметилгидроксипиридина сукцината в составе трансдермального пластыря установлено, что УФ-спектры поглощения растворов пластыря и РСО мексидола в области от 240 до 340 нм имеют максимум при одной и той же длине волны (297±3 нм). Проведение ТСХ также подтвержда-

ет наличие этилметилгидроксипиридина сукцината в составе трансдермального пластыря.

Тест «Растворение» *in vitro* является биофармацевтическим методом исследования и широко используется в фармации не только для оценки биофармацевтических свойств ЛП с контролируемым высвобождением, стабильности ЛП, но и стандартизации ЛФ, таких как таблетки, капсулы, суспензии, трансдермальные пластыри, мази, суппозитории, вагинальные таблетки, жевательная резинка для медицинского применения, имплантаты.

Для ТТС при проведении теста «Растворение» профиль растворения должен включать не менее трёх временных интервалов в течение 24 ч наблюдения, позволяющих определить начало высвобождения ФС, время максимального высвобождения, а также временной период, подтверждающий пролонгированный характер высвобождения ФС из ЛФ. Результаты проведенного эксперимента представлены на рисунке 1.

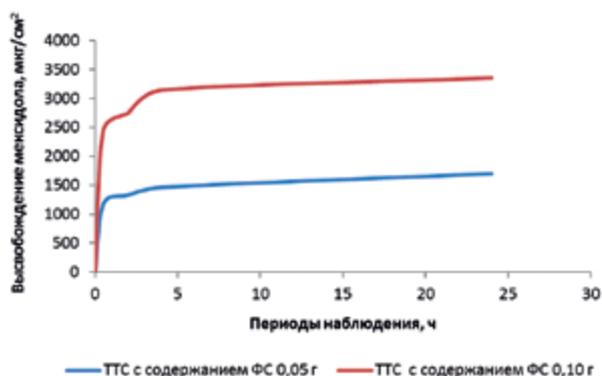


Рисунок 1. Типичный профиль высвобождения *in vitro* мексидола из пластырей с различным его содержанием по тесту «Растворение»

Из данных, приведенных на рисунке 1, видно, что характер кинетических кривых подачи мексидола из исследуемых пластырей совпадает, указывая на то, что скорость трансдермальной подачи изменяется пропорционально содержанию мексидола в ЛФ. В интервале 4–24 ч с момента начала опыта кинетическая кривая близка к прямой, следовательно, трансдермальная подача мексидола осуществляется с постоянной скоростью $11,90 \pm 0,79$ мкг/ч·см², а степень высвобождения ФС из пластыря к 24 часу составила 80%.

Таким образом, при включении данной методики в ФСП с целью стандартизации ЛФ следует считать, что степень высвобождения мексидола из пластыря через 30 мин должна составлять не более 62%, через 2 ч – свыше 62% и не более 70%, через 4 ч – от 70% до 80%, через 24 ч – более 80%.

Для подтверждения способности трансдермального этилметилгидроксипиридина сукцината к чрескожному транспорту были проведены сравнительные биофармацевтические исследования *in vivo* и *in vitro*

с использованием лоскутов «переживающей» кожи крыс.

Согласно данным литературы, белки кожи имеют собственное поглощение в области 230–300 нм [18]. На протяжении 72 ч эксперимента *in vivo* максимумы поглощения в опытном и контрольном резервуарах (276 ± 2 нм) не отличались друг от друга и свидетельствовали о высвобождении только структурных компонентов гиподермы. Поэтому далее в качестве экспериментальной модели для изучения проницаемости кожи *in vitro* использовали модель «переживающей» кожи животных, с лоскутов которой удаляли слой гиподермы, обильно пронизанный сетью капилляров. Разведение диализата анализировали УФ-спектрофотометрически в диапазоне волн 240–340 нм.

Отличительные особенности УФ-спектров разведений опытного и контрольного резервуаров при использовании лоскутов кожи с удаленной гиподермой зафиксированы только через 6 ч наблюдения: в контрольном образце максимум поглощения спектра соответствовал длине волны 276 ± 2 нм, в опытном образце – $291,5 \pm 2$ нм.

При проведении эксперимента по изучению количественной оценки трансдермальной проницаемости мексидола в смыве с поверхности кожи было обнаружено $25,0 \pm 2,3\%$ этилметилгидроксипиридина сукцината.

Одним из первых этапов фармакологических исследований явилось изучение раздражающего действия трансдермальных пластырей с этилметилгидроксипиридина сукцинатом для установления величины их раздражающего эффекта на слизистую оболочку глаза морских свинок. Местнораздражающее действие пластыря при длительном контакте с кожей проверяли на коже морских свинок, морфологические изменения кожи при применении разработанных пластырей изучали гистологически.

ТТС пластырного типа не оказывали раздражающего действия при нанесении изотонического раствора компонентов матрицы на конъюнктиву глаза морских свинок. Результаты исследования местнораздражающего действия, гиперчувствительности кожи после многократных аппликаций позволяют отнести изучаемые пластыри с мексидолом к нулевому классу выраженности раздражающих веществ по классификации И.В. Санюцкого и Н.Г. Иванова [19].

Литературные данные свидетельствуют о том, что разнообразные ФС при нанесении на поверхность кожи могут воздействовать на её морфофункциональные свойства. С целью изучения возможного воздействия компонентов пластырей на структуру кожи были проведены гистоморфологические исследования срезов кожи морских свинок. По истечении времени аппликации пластыря с этилметилгидроксипиридина сукцинатом, составившего 5 дней, установлено выраженное утолщение эпидермиса, диффузная лейкоцитарная инфильтрация, отражающая реакцию всех участков кожи на тримингование, гипертрофия сальных желёз. При

этом раздражающего действия на кожу крыс и других патологических её изменений не выявлено.

Таким образом, проведенные разносторонние исследования позволяют считать возможным трансдермальное применение отечественного лекарственного средства мексидол. Настоящее утверждение является вполне доказательным, так как выбор оптимального состава пластыря был спрогнозирован с помощью компьютерного моделирования и подтвержден биофармацевтическим исследованием *in vitro* и *in vivo*, фармакокинетическими и фармакологическими положительными показателями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые разработана трансдермальная терапевтическая система с мексидолом матриксного типа. В качестве вспомогательного комплекса трансдермальная терапевтическая система содержит пропиленгликоль-1,2, поливинилпирролидон высокомолекулярный.
2. Проведенные квантово-химические расчёты физико-химических дескрипторов действующих компонентов и вспомогательных веществ: теплоты гидратации, энергии гидратации, теплоты образования молекулы с учётом эффекта гидратации, величины десятичного логарифма коэффициента распределения в модельной системе «октанол – вода» – позволили упростить выбор оптимальных составов трансдермальных пластырей с этилметилгидроксипиридина сукцинатом.
3. В результате проведения биофармацевтических исследований по выбору оптимальной композиции вспомогательных веществ с помощью модифицированной методики диализа через биологическую мембрану рассчитаны скорость трансдермальной подачи мексидола $1,105 \pm 0,011$ мкг/ч·см², степень высвобождения 56,88% и коэффициент использования его матрицы 56,81%.
4. Исследована стабильность трансдермальных терапевтических систем с мексидолом методом долгосрочных испытаний при хранении в различных упаковках. Сконструирована герметичная светонепроницаемая упаковка, обеспечивающая сохранность пластырей в течение 2 лет.
5. Исследован и доказан чрескожный транспорт этилметилгидроксипиридина сукцината с использованием биофармацевтических методов *in vivo* и *in vitro*.
6. Разработаны нормы качества для трансдермальной терапевтической системы с этилметилгидроксипиридина сукцинатом по основным показателям.
7. Проведены биологические исследования трансдермальных терапевтических систем с этилметилгидроксипиридина сукцинатом по оценке раздражающего, местнораздражающего действия и гиперчувствительности кожи, позволяющие отнести разработанные пластыри к 0 классу выраженности раздражающих свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петров В. И. Кластерный подход при создании инновационных лекарственных средств // Экономические и гуманитарные исследования регионов. 2012. № 5. С. 6–14. [Petrov V. I. Klasternyi podkhod pri sozdanii innovatsionnykh lekarstvennykh sredstv // Ekonomicheskie i gumanitarnye issledovaniya regionov. [Cluster approach in creating innovative medicines // Economic and humanitarian studies of regions.] 2012. № 5. S. 6–14.]
2. Сампиев А. М., Никифорова Е. Б., Давитавян Н. А. Современные достижения в разработке и применении инновационных лекарственных средств // Новые технологии. 2012. № 2. С. 247–254. [Sampiev A. M., Nikiforova E. B., Davitavyan N. A. Sovremennye dostizheniya v razrabotke i primeneni innovatsionnykh lekarstvennykh sredstv // Novye tekhnologii. [Modern achievements in the development and application of innovative medicines // New technologies.] 2012. № 2. S. 247–254.]
3. Береговых В. В., Пятигорская Н. В., Прудкевич Ю. А. Трансдермальные терапевтические системы доставки лекарственных средств // Вестник МИХТХ. 2012. Т. 7. № 5. С. 17–22. [Beregovykh V. V., Pyatigorskaya N. V., Prudkevich Yu. A. Transdermal'nye terapevticheskie sistemy dostavki lekarstvennykh sredstv // Vestnik MIKHTKh. [Transdermal therapeutic drug delivery systems // Vestnik MIHTKh.] 2012. T. 7. № 5. S. 17–22.]
4. Ерофеева С. Б. Место препарата мексидол в профилактике и лечении цереброваскулярных заболеваний // Фарматека. 2009. № 11. С. 34–38. [Erofeeva S. B. Mesto preparata meksidol v profilaktike i lechenii tserebrovaskulyarnykh zabolevaniy // Farmateka. [Place mexidol in the prevention and treatment of cerebrovascular diseases // Pharmateka.] 2009. № 11. S. 34–38.]
5. Государственный реестр лекарственных средств. – М., 2018. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx> (дата обращения 28.02.18).
6. Быков В. А., Алексеев М. В., Воротников А. И. Современное состояние и перспективы создания новых эстетико-, арома- и фитотерапевтических трансдермальных косметических средств (Обзор) // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2012. № 1(10). С. 122–134. [Bykov V. A., Alekseev M. V., Vorotnikov A. I. Sovremennoe sostoyanie i perspektivy sozdaniya novykh estetico-, aroma- i fitoterapevticheskikh transdermal'nykh kosmeticheskikh sredstv (Obzor) // Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsetvicheskoi khimii. [Current state and Perspectives for the creation of new aesthetic, aroma and phytotherapeutic transdermal cosmetic products (Review) // Questions of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry.] 2012. № 1(10). S. 122–134.]
7. Морина Е. А. Разработка трансдермальных лекарственных форм флаволигнанов: автореф. дис. ... к.фарм.н. – М., 2010. 23 с. [Morina E. A. Razrabotka transdermal'nykh lekarstvennykh form flavolignanov: avtoref. dis. ... k.farm.n. [Development of transdermal dosage forms of flavolignans: author's abstract. dis. ... Ph.D.] – М., 2010. 23 s.]
8. Луценко С. В., Фельдман Н. Б., Луценко Е. В., Быков В. А. Растительные флаволигнаны. Биологическая активность и терапевтический потенциал. – М., 2006. 235 с. [Lutsenko S. V., Fel'dman N. B., Lutsenko E. V., Bykov V. A. Rastitel'nye flavolignany. Biologicheskaya aktivnost' i terapevticheskii potentsial. [Plant flavolignanes. Biological activity and therapeutic potential.] – М., 2006. 235 s.]
9. Мизина П. Г. Теоретическое и экспериментальное обоснование создания аппликационных лекарственных форм на основе растительных фенилпропаноидов // Фармация. 2003. № 3. С. 36. [Mizina P. G. Teoreticheskoe i eksperimental'noe obosnovanie sozdaniya aplikatsionnykh lekarstvennykh form na osnove rastitel'nykh fenilpropanoidov // Farmatsiya. [Theoretical and experimental substantiation of the creation of application medicinal forms on the basis of plant phenylpropanoids // Pharmacia.] 2003. № 3. S. 36.]
10. Морозов Ю. А. Изучение способности лигнанов лимонника китайского к чрескожной проницаемости в эксперименте // Медицинский вестник Башкортостана. 2016. № 11(2-62). С. 58–62. [Morozov Yu. A. Izuchenie sposobnosti lignanov limonnika kitaiskogo k chreskozhoi pronitsaemosti v eksperimente // Meditsinskii vestnik Bashkortostana. [A study of the ability of Chinese magnolia lignans to percutaneous permeability in an experiment // Medical Bulletin of Bashkortostan.] 2016. № 11(2-62). S. 58–62.]
11. Макиева М. С., Морозов Ю. А., Воронков А. В. и др. Разработка трансдермального геля с маслом лимонника китайского и оценка степени его влияния на работоспособность и неврологический статус животных в эксперименте // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016. № 4(11). С. 532–536. [Makieva M. S., Morozov Yu. A., Voronkov A. V. et al. Razrabotka transdermal'nogo gelya s maslom limonnika kitaiskogo i otsenka stepeni ego vliyaniya na rabotosposobnost' i nevrologicheskii status zhivotnykh v eksperimente // Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza. 2016. № 4(11). S. 532–536.]

zov Yu. A., Voronkov A. V. i dr. Razrabotka transdermal'nogo gelya s maslom limonnika kitaiskogo i otsenka stepeni ego vliyaniya na rabotosposobnost' i nevrologicheskii status zhivotnykh v eksperimente // Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza. [Development of a transdermal gel with Schisandra oil chinese evaluation of the degree of its impact on performance and neurological the status of animals in the experiment, // Medical Gazette of the North Caucasus.] 2016. № 4(11). S. 532–536.]

12. Лосенкова С. О., Степанова Э. Ф., Новиков В. Е. Особенности методики биофармацевтического исследования трансдермального пластыря с мексидолом // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия, Биология, Фармация. 2009. № 1. С. 113–116. [Losenkova S. O., Stepanova E. F., Novikov V. E. Osobennosti metodiki biofarmatsevticheskogo issledovaniya transdermal'nogo plastyrya s meksidolom // Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya, Biologiya, Farmatsiya. 2009. № 1. С. 113–116.]
13. Лосенкова С. О., Степанова Э. Ф., Новиков В. Е. Биофармацевтические исследования *in vitro* трансдермальных пластырей с мексидолом // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2010. № 1. С. 117–122. [Losenkova S. O., Stepanova E. F., Novikov V. E. Biofarmatsevticheskie

issledovaniya in vitro transdermal'nykh plastyrei s meksidolom // Kurskii nauchno-prakticheskii vestnik «Chelovek i ego zdorov'e». [Biopharmaceutical studies in vitro of transdermal patches with mexidol // KursThe scientific and practical bulletin «The Man and His Health».] 2010. № 1. S. 117–122.]

14. Лосенкова С. О., Погребняк А. В., Морозов Ю. А. и др. Компьютерное моделирование как один из современных методов прогнозирования в фармацевтической технологии // Фармация и фармакология. 2014. № 6(7). С. 105–113. [Losenkova S. O., Pogrebnyak A. V., Morozov Yu. A. i dr. Komp'yuternoe modelirovanie kak odin iz sovremennykh metodov prognozirovaniya v farmatsevticheskoi tekhnologii // Farmatsiya i farmakologiya. 2014. № 6(7). С. 105–113.]
15. Патент РФ 1459215, МКИ C08L 39/06, А61К 31/79. Состав полимерной диффузионной матрицы для трансдермального введения лекарственных веществ / Васильев А. Е. и др. – № 4189829/05; заявл. 20.12.86; опубл. 20.11.95, Бюл. № 52. 18 с.
16. Васильев А. Е., Краснюк И. И., Равикумар С. и др. Трансдермальные терапевтические системы доставки лекарственных веществ (Обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2001. Т. 36. № 11. С. 29–42. [Vasil'ev A. E., Krasnyuk I. I., Ravikumar S. i dr. Transdermal'nye terapevticheskie sistemy dostavki lekarstvennykh veshchestv

(Obzor) // Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal. [Transdermal therapeutic drug delivery systems (Review) // Chemical-pharmaceutical journal.] 2001. Т. 36. № 11. S. 29–42.]

17. Максименко О. О., Равикумар С., Андреев С. М. и др. Стабильность трансдермальных терапевтических систем с индометацином // Химико-фармацевтический журнал. 2001. Т. 35. № 10. С. 53–55. [Maksimenko O. O., Ravikumar S., Andreev S. M. i dr. Stabil'nost' transdermal'nykh terapevticheskikh sistem s indometatsinom // Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal. [Stability of transdermal therapeutic systems with indomethacin // Chemical-Pharmaceutical Journal.] 2001. Т. 35. № 10. S. 53–55.]
18. Погорельцев В. И., Гармонов С. Ю., Евгеньев М. И. Фармакокинетика ксимедона // Химико-фармацевтический журнал. 2006. Т. 40. № 7. С. 5–8. [Pogoreltsev V. I., Garmonov S. Yu., Evgen'ev M. I. Farmakokinetika ksimedona // Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal. Pharmacokinetics of xymedon // Chemical-Pharmaceutical Journal.] 2006. Т. 40. № 7. S. 5–8.]
19. Алексеева О. Г., Петкевич А. И. К методике определения аллергенных свойств химических веществ // Гигиена и санитария. 1972. № 3. С. 64–67. [Aleksееva O. G., Petkevich A. I. K metodike opredeleniya allergennykh svoystv khimicheskikh veshchestv // Gigiena i sanitariya. [o the technique for determining the allergenic properties of chemical substances // Hygiene and Sanitation.] 1972. № 3. S. 64–67.]

МЕКСИДОЛ®

этилметилгидроксипиридина сукцинат



Препарат выбора №1, 2014¹

- Референтный (оригинальный) препарат^{3, 4}
- Противоишемическое действие, антигипоксанта́ный и антиоксидантный эффекты^{5, 6}
- Максимальное количество показаний в инструкции по медицинскому применению (для соответствующих лекарственных форм препаратов с группировочным наименованием "этилметилгидроксипиридина сукцинат")^{7, 9, 10}
- Инъекционная и таблетированная лекарственные формы, возможность последовательной терапии^{8, 9, 10}
- Возможность использования максимальной суточной дозировки при парентеральном введении и приеме *per os*^{7, 9, 10}

1. Награда Russian Pharma Awards 2014 за достижения в области фармации. 1 место в номинации «Препарат выбора при лечении ишемических расстройств, вызванных спазмом сосудов головного мозга». 2. Премия Молекула жизни® за достижения в области фармации в номинации Препарат года, 2016 г. Учредитель премии: Российское научное медицинское общество терапевтов (РНМОТ). 3. Письмо Минздрава России №20-3/1262 от 19.09.2016 г., Письмо ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России №13586 от 09.09.2016 г. Данные находятся в досье компании. 4. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (ред. от 28.12.2017 г.). 5. Погорельский В.Е., Арлыт А.В., Гавевый М.Д. с соавт. Экспериментальная и клиническая фармакология, 1999, Том 62, №5, стр.15-17. 6. Нечипуренко Н.И., Васильева Н.А. с соавт. Биолетень экспериментальной биологии и медицины, 2006, Приложение 1. 7. Инструкция по медицинскому применению препаратов с группировочным наименованием: этилметилгидроксипиридина сукцинат. Источник информации: Государственный реестр лекарственных средств, www.grls.rosminzdrav.ru на 30.05.2017 г. 8. Стаховская Л.В., Шамалов Н.А., Хасанова Д.Р., Мельникова Е.В. с соавт. Журнал неврологии и психиатрии, 2017; 3 (2):55-64. 9. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Мексидол®, раствор для в/в и в/м введения 50 мг/мл Р N002161/01 от 14.03.2008 г., дата переоформления 29.08.2017 г. 10. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Мексидол®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 125 мг ЛСР-002063/07 от 09.08.2007 г., дата переоформления 08.12.2015 г. 11. Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2017 год, распоряжение Правительства РФ от 28.12.2016 г. №2885-р. 12. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 29.12.2012 г. №1740-н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при инфаркте мозга».

Reg. №: таблетки, покрытые пленочной оболочкой 125 мг – ЛСР-002063/07 от 09.08.2007 г., дата переоформления 08.12.2015 г.
 Reg. №: раствор для в/в и в/м введения 50 мг/мл – Р N002161/01 от 14.03.2008 г., дата переоформления 29.08.2017 г.
 Информация предназначена для специалистов здравоохранения. Перед назначением ознакомьтесь с инструкцией по медицинскому применению.
 ООО «ВекторФарм», 121069, г. Москва, Новинский бульвар, д. 18, стр. 1, помещение VIII, тел: +7 (495) 626-47-50.

ООО «ВЕКТОРФАРМ»
 дистрибьютор лекарственных препаратов
 ООО «НПК «ФАРМАСОФТ»
 ФАРМАСОФТ

УДК 615.322

РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ГРАНУЛ В ТВЁРДЫХ ЖЕЛАТИНОВЫХ КАПСУЛАХ НА ОСНОВЕ КОМПОЗИЦИИ СУХИХ ЭКСТРАКТОВ ЧЕРЕДЫ ТРЕХРАЗДЕЛЬНОЙ ТРАВЫ, ЗОЛОТАРНИКА КАНАДСКОГО ТРАВЫ, РЕПЕШКА ОБЫКНОВЕННОГО ТРАВЫ

Е. К. Новикова¹, Д. А. Чачин¹, И. Е. Каухова^{1*}, С. А. Минина¹

Резюме. Целью исследования является разработка и стандартизация гранул в твердых желатиновых капсулах на основе композиции сухих экстрактов череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы, обладающей нефропротекторной и антифибротической активностью при токсических нефропатиях. Разработан состав и определены показатели качества гранул с сухими экстрактами череды трехраздельной, золотарника канадского, репешка обыкновенного травы. Разработана спецификация качества на лекарственное средство - гранулы композиции сухих экстрактов в твердых желатиновых капсулах.

Ключевые слова: череды трехраздельной трава, золотарника канадского трава, репешка обыкновенного трава, сухие экстракты, гранулы, твердые желатиновые капсулы, показатели качества.

DEVELOPMENT AND STANDARDIZATION OF GRANULES IN HARD GELATIN CAPSULES BASED ON THE COMPOSITION OF DRY EXTRACTS OF *BIDENS TRIPARTITA*, *SOLIDAGO CANADENSIS* L. AND *AGRIMONIA EUPATORIA* HERBS

Е. К. Novikova¹, D. A. Chachin¹, I. E. Kauhova¹, S. A. Minina¹

Abstract. The aim of the study is the development and standardization of granules in hard gelatin capsules based on the composition of dry extracts of *Bidens tripartita* L., *Solidago canadensis* L. and *Agrimonia eupatoria* L. herbs, possessing nephroprotective activity and antifibrotics in toxic nephropathies. Developed the structure and defined the quality indicators of the pellets with dry extracts of *Bidens tripartita* L., *Solidago canadensis* L. and *Agrimonia eupatoria* L. herbs. The quality specification for the drug – granules of the composition of dry extracts in solid gelatin capsules is developed.

Keywords: *Biden stripartita* L., *Solidago canadensis* L., *Agrimonia eupatoria* L. herbs, dry extracts, granules, hard gelatin capsules, quality indicators.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., Saint-Petersbourg, 197376, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: irina.kauhova@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Анализ уро- и нефрологической заболеваемости в России по данным официальной статистики за последние годы показал увеличение абсолютного числа зарегистрированных больных с заболеваниями мочеполовой системы ежегодно на 25,8% [1]. Это обуславливает актуальность разработки препаратов для лечения заболеваний почек, в том числе растительно-го происхождения. Репешок обыкновенный обладает гастро- и гепатопротекторными свойствами, улучшает работу органов пищеварения, защищает печень от токсического действия этанола [3]. Черда трехраздельная обладает выраженными диуретическими и иммуномодулирующими свойствами, противоаллергическим действием, используется в педиатрической практике [4]. Золотарник канадский давно применяется для создания урологических препаратов, показал высокую эффективность и безопасность, входит в состав фитопрепаратов для лечения простатита [5]. Фар-

макологические исследования показали, что композиция сухих экстрактов сухих экстрактов золотарника канадского травы, череды трехраздельной травы, репешка обыкновенного травы обладает нефропротекторной и антифибротической активностью при токсических нефропатиях [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для разработки технологии гранул в твердых желатиновых капсулах использовали сухие экстракты череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы, стандартизованные в соответствии с требованиями ГФ XIII изд [2, 7].

Гранулы получали методом продавливания увлажнённой массы через сито с отверстиями диаметром 3 мм. Высушенные в сушильном шкафу ШС-80-01 (Россия) при температуре не более 60 °С в течение 30 мин

гранулы повторно протирали через сито с отверстиями диаметром 1,5 мм и опудривали кальция стеаратом.

В качестве увлажняющей жидкости использовали 5-процентный раствор метилцеллюлозы. В качестве наполнителя был использован лактозы моногидрат, широко применяемый для снижения гигроскопичности растительных экстрактов.

Качественный анализ флавоноидов в гранулах на основе композиции сухих экстрактов череды трёхраздельной, золотарника канадского и репешка обыкновенного проводили методом тонкослойной хроматографии в системе бутан-1-ол – ледяная уксусная кислота – вода (БУВ) в соотношении (4:1:2). На линию старта хроматографической пластинки марки «Sorbfil», ПТСХ-П-А-УФ (Россия), размера 10x15 см, наносили в виде пятен спирто-водный раствор композиции и раствор стандартного образца (СО) рутина [Rutin hydrate R5143 SIGMA, содержание рутина ≥94% (HPLC), годен до 2.02.2019 г.]. Качественный анализ сапонинов в гранулах на основе композиции сухих экстрактов череды трёхраздельной, золотарника канадского и репешка обыкновенного проводили методом тонкослойной хроматографии в системе бутанол – этанол – аммиак (7:2:5). На линию старта хроматографической пластинки марки «Sorbfil», ПТСХ-П-А-УФ (Россия), размера 10x15 см, наносили в виде пятен спирто-водный раствор композиции и раствор стандартного образца (СО) β-эсцина (β-Aescin, Bio Chemika, Германия, кат. № А7749, содержание β-эсцина ≥99%, годен до 04.01.2019 г.).

Качественный анализ дубильных веществ в гранулах на основе композиции сухих экстрактов череды трёхраздельной, золотарника канадского и репешка обыкновенного проводили методом тонкослойной хроматографии в системе бутан-1-ол – ледяная уксусная кислота – вода (БУВ) в соотношении (10:3:7). На линию старта хроматографической пластинки марки «Sorbfil», ПТСХ-П-А-УФ (Россия), размера 10x15 см, наносили в виде пятен спирто-водный раствор композиции и раствор стандартного образца (СО) танин (Tanin, Sigma-Aldrich CAS,1401-55-4, содержание танина ≥98%, годен до 12.12.2018 г.).

Содержание суммы флавоноидов в гранулах на основе композиции сухих экстрактов череды трёхраздельной, золотарника канадского и репешка обыкновенного в пересчёте на рутин определяли спектрофотометрическим методом. Около 0,15 г (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 30 мл спирта 70%, перемешивали в течение 40 мин, доводили объём 70% спиртом до метки, перемешивали и фильтровали, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А). Испытуемый раствор готовили следующим образом: переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл 1 мл раствора А, добавляли 2 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, доводили объём раствора спиртом этиловым до метки и перемешивали (раствор Б). Измеряли оптиче-

скую плотность раствора Б на спектрофотометре UV-mini-1240 (Shimadzu, Япония) при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1 мл раствора А, 1 капли разведенной уксусной кислоты, и доводили спиртом до метки в колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно проводили измерение оптической плотности раствора рабочего стандартного образца (PCO) рутина.

Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин рассчитывали по следующей формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 50,0 \times 25,0 \times 100,0 \times 100,0}{D_0 \times m_1 \times 100,0 \times 25,0 \times (100,0 - W)}$$

где X – сумма флавоноидов в пересчёте на рутин, %; D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора PCO рутина; m_0 – масса ГСО рутина, г; m_1 – масса гранул, г; W – потеря в массе при высушивании, %.

Примечание 1. Приготовление раствора PCO рутина. 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130–135 °С, растворяли в 85 мл 96% этилового спирта в колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждали до комнатной температуры, доводили объём раствора до метки тем же спиртом и тщательно перемешивали. Переносили 10 мл раствора в мерную колбу вместимостью 25 мл и добавляли 1 мл 2% раствора алюминия хлорида в спирте 96% и 1 каплю 2% раствора уксусной кислоты, доводили объём раствора до метки тем же спиртом.

Примечание 2. Приготовление алюминия хлорида спиртового раствора 2%. 2 г алюминия хлорида гексагидрата растворяли в 40 мл спирта 96% в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводили объём раствора тем же спиртом до метки.

Содержание суммы сапонинов в гранулах на основе композиции сухих экстрактов череды трёхраздельной, золотарника канадского и репешка обыкновенного в пересчёте на β-эсцин определяли спектрофотометрическим методом. Точную навеску 0,15 г помещали в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, прибавляли 30,0 мл спирта этилового 70%-го, и перемешивали в течение 30 мин. Затем доводили объём раствора до метки тем же спиртом, перемешивали и фильтровали. Первые 10,0 мл фильтрата – раствор «А». 1,0 мл раствора «А» переносили в мерную колбу вместимостью 100,0 (мл) и доводили объём раствора спиртом этиловым заданной концентрации, перемешивали –раствор «Б». Затем 1,0 мл полученного раствора «Б» переносили в бюкс, добавляли 4,0 мл серной кислоты концентрированной, и термостатировали в течение 30 мин при температуре 70 °С. После бюкс охлаждали под струёй холодной воды около 2–3 мин.

Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре UV-mini-1240 (Shimadzu, Япония) при длине волны 325 нм в кювете толщиной 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали серную кислоту концентрированную.

Содержание суммы сапонинов рассчитывали по следующей формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 100,0 \times 100,0 \times 100,0 \times 100,0}{D_0 \times m_1 \times 100,0 \times (100,0 - W)},$$

где X – сумма сапонинов в пересчёте на β -эсцин, %; D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора СО β -эсцина; m_0 – масса СО β -эсцина, г; m_1 – масса гранул, г; W – потеря в массе при высушивании, %.

Приготовление стандартного раствора β -эсцина

Около 0,0059 г государственного стандартного образца (ГСО) β -эсцина (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100,0 мл и при перемешивании растворяли в спирте этиловом 70%-ом. Затем 1,0 мл полученного раствора помещали в бюкс, добавляли 4,0 мл серной кислоты концентрированной и термостатировали в аналогичных условиях – то есть в течение 30 мин при температуре 70 °С. После бюкс охлаждали под струёй холодной воды около 2–3 мин.

Анализ лекарственной формы проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.4.1.0005.15 «Капсулы» [2]. Однородность массы дозированной лекарственной формы определяли в соответствии с ОФС 1.4.2.0009.15.

Испытания на распадаемость проводили в соответствии с ОФС 1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул» [2] с использованием Тестера распадаемости ERWEKA серии ZT 220, Германия. Тест на растворение проводили в соответствии с ОФС 1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» [2]. Испытания проводили с использованием тестера ERWEKA DT 12, Германия. В качестве среды для растворения взята вода очищенная. Оценка теста проводилась по высвобождению суммы флавоноидов в пересчете на рутин спектофотометрическим методом.

Стабильность оценивали в соответствии с требованиями ОФС 1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств» [2].

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве лекарственной формы для композиции сухих экстрактов череды трёхраздельной, золотарника канадского и репешка обыкновенного травы

были выбраны капсулы, обладающие рядом преимуществ перед другими лекарственными формами.

Состав композиции сухих экстрактов травы череды трёхраздельной, травы золотарника канадского и травы репешка обыкновенного был предложен на основании проведенных фармакологических исследований [5] Процентный состав всех трёх компонентов композиции представлен в таблице 1.

Таблица 1.

Состав композиции сухих экстрактов

Наименование компонента	Содержание компонентов в суммарном сухом экстракте, %
Сухой экстракт череды трёхраздельной, содержание флавоноидов	6,68 1,08
Сухой экстракт золотарника канадского, содержание тритерпеновых сапонинов	66,66 4,88
Сухой экстракт репешка обыкновенного, содержание дубильных веществ	26,66 5,12

В результате проведенного комплекса исследований разработан состав гранул в твердых желатиновых капсулах композиции сухих экстрактов череды трёхраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы. Согласно фармакологическим исследованиям суточная норма композиции составляет – 593 мг/сут. Исходя из этого предусматривается разделение суточной дозы на три индивидуальных приёма. Тем самым масса содержимого твёрдой желатиновой капсулы составит – 400 мг. Состав гранул на одну твёрдую желатиновую капсулу представлен в таблице 2.

Таблица 2.

Состав гранул композиции сухих экстрактов череды трёхраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы в твердых желатиновых капсулах

Наименование компонентов	Масса компонентов, мг	Содержание компонентов в одной капсуле, %
Сухой экстракт череды трёхраздельной	13,2	3,29
Сухой экстракт череды трёхраздельной	131,8	32,90
Сухой экстракт череды трёхраздельной	52,7	13,16
Метилцеллюлоза, Мц 16	4,6	1,30
Лактозы моногидрат	197,7	49,35
Общая масса:	400,0	100,0

Предложены показатели качества гранул композиции сухих экстрактов череды трёхраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы (таблица 3).

Таблица 3.

Показатели качества гранул композиции сухих экстрактов череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы

Тесты	Методы	Нормы	Экспериментальные значения
Описание	Визуально	Гранулы круглой, цилиндрической или неправильной формы однородные по цвету	Гранулы круглой формы темно-коричневого цвета
Размер гранул	ГФ XIII	От 0,2–3,0 мм	От 0,5–1,0 мм
Подлинность	ТСХ ГФ XIII	Не менее трех пятен с Rf 0,64; 0,79 и 0,90, соответствующие флавоноидам. Не менее двух пятен с Rf 0,4–0,6, соответствующие сапонидам. Пятно с Rf 0,37±0,02, соответствующее танину	Не менее трех пятен с Rf 0,64; 0,79; 0,90, соответствующие флавоноидам Не менее двух пятен с Rf 0,4–0,6, соответствующие сапонидам Пятно с Rf 0,37±0,02, соответствующее танину
Количественное содержание флавоноидов, %	Спектрофотометрический ГФ XIII	Не менее 0,45	0,53±0,15
Количественное содержание сапонинов, %	Спектрофотометрический ГФ XIII	Не менее 2,00	2,51±0,09
Потеря в массе при высушивании, %	ГФ XIII	Не более 5,0	1,81±0,47
Распадаемость, мин	ГФ XIII	В течение 15 мин	6–10 мин
Растворени, %	ГФ XIII	Не менее 75% в течение 30 мин	93,3±1,7
Тяжелые металлы, %	ГФ XIII	Не более 0,01	0,00417
Упаковка	В банках из темного стекла, укупоренных навинчиваемыми пластмассовыми крышками с прокладками		
Хранение	В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С		
Срок годности	2 года		

Полученные гранулы направляли на стадию капсулирования в твердые желатиновые капсулы. Контроль качества полученных твердых желатиновых капсул с гранулами на основе сухих экстрактов череды трехраздельной, золотарника канадского и репешка обыкновенного проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII изд.

Изучение стабильности капсул в процессе хранения проводили на пяти сериях лекарственного препарата, полученных из разных партий субстанций. Оценка качества капсул проводили по показателям качества, таким как описание, подлинность, средняя масса капсул, распадаемость, растворение и количественное определение. Срок годности капсул с гранулами композиции сухих экстрактов был предварительно определен «методом ускоренного старения», который составил 2 года. Для подтверждения установленного срока продолжено изучение стабильности капсул с гранулами растительных экстрактов в условиях долгосрочных испытаний в течение заявленного срока годности. Установлено, что капсулы с гранулами растительных экстрактов остаются стабильными в течение 2 лет – срок наблюдений.

По результатам исследований составлена таблица спецификации качества гранул композиции сухих экстрактов череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы в твердых желатиновых капсулах (таблица 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан состав гранул на основе композиции сухих экстрактов череды трёхраздельной, золотарника канадского и репешка обыкновенного. Предложены показатели качества гранул на основе композиции сухих экстрактов. Установлены показатели качества и сроки годности готовой лекарственной формы на основе композиции сухих экстрактов череды трёхраздельной, золотарника канадского и репешка обыкновенного в виде гранул в твердых желатиновых капсулах. Разработана спецификация качества на лекарственное средство на основе композиции сухих растительных экстрактов для лечения и профилактики поражений почек.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аполихин О. И., Сиков А. В., Мосчкалева Н. Г., Солнцева Т. В., Комарова В. А. Анализ уронефрологической заболеваемости и смертности в Российской Федерации за десятилетний период (2302–2012 гг.) по данным официальной статистики // Экспериментальная и клиническая урология. 2014. № 2. С. 4–13. [Apolihin O. I., Sikov A. V., Moschkaleva N. G., Solnceva T. V., Komarova V. A. Analiz uronefrologicheskoj zaboлеваemosti i smertnosti v Rossijskoj Federacii za desjatiletnij period (2302–2012 gg.) po dannym oficial'noj statistiki // Jeksperimental'naja i klinicheskaja urologija. [Analysis of uronephrological morbidity and mortality in the Russian Federation over a ten-year period (2302–2012) according to official statistics // Experimental and Clinical Urology.] 2014. № 2. P. 4–13.]

Таблица 4.

Спецификация показателей качества капсул с гранулами композиции сухих экстрактов череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы

Тесты	Методы	Нормы	Экспериментальные значения
Описание	Визуально	Одноцветные белые твердые желатиновые капсулы цилиндрической формы с полусферическими концами с гранулами темно-коричневого цвета внутри	Соответствует
Подлинность	ТСХ ГФ XIII	Не менее трех пятен с Rf 0,6-0,9, соответствующие флавоноидам. Не менее двух пятен с Rf 0,4-0,6, соответствующие сапонинам. Пятно с Rf 0,37±0,02, соответствующее танину	Соответствует
Количественное содержание флавоноидов, %	Спектрофотометрический ГФ XIII	Не менее 0,45%	0,53±0,05
Количественное содержание тритерпеновых сапонинов, %	Спектрофотометрический ГФ XIII	Не менее 2,00%	2,51±0,10
Однородность массы дозирования, %	ГФ XIII	Допустимое отклонение 7,5%	Соответствует
Распадаемость, мин	ГФ XIII	в течение 15 мин	6–8 мин
Растворение, %	ГФ XIII	Не менее 75% в течение 30 мин	87,3±1,4
Потеря в массе при высушивании, %	ГФ XIII	Не более 5,0	1,91±0,47
Тяжелые металлы, %	ГФ XIII	Не более 0,01	0,006±0,001
Упаковка	В банках из темного стекла, укупоренных навинчиваемыми пластмассовыми крышками с прокладками		
Хранение	В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 15 °С		
Срок годности	2 года		

- Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII изд. – М., 2015. В 3-х ч. Т. 1. / МЗ РФ. М., 2015. 1470 с. [Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. XIII izd. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII ed.] – М., 2015. В 3-р ч. Т. 1. / MZ RF. М., 2015. 1470 p.]
- Губанов И. А., Киселева К. В., Новиков В. С., Тихомиров В. Н. *Agrimonia eupatoria* L. – Репешок обыкновенный, или лекарственный // В кн.: Иллюстрированный определитель растений Средней России. Т. 2. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестковые). М., 2004. С. 356. [Gubanov I. A., Kiselev K. V., Novikov V. S., Tihomirov V. N. *Agrimonia eupatoria* L. – Repeshok obyknovennyj, ili lekarstvennyj // V kn.: Illjustrirovannyj opredelitel' rastenij Srednej Rossii. T. 2. Pokrytosemennye (dvudol'nye: razdel'nolepestkovyje). [Agrimonia eupatoria L. – Common cod, or medicinal // In the book: Illustrated determinant of plants in Central Russia. T. 2. Angiosperms (dicotyledons: separate-petal).] М., 2004. P. 356.]
- Губанов И. А., Киселева К. В., Новиков В. С., Тихомиров В. Н. *Bidens tripartite* L. – Черда трехраздельная // В кн.: Иллюстрированный определитель растений Средней России. Т. 2. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестковые). М., 2004. С. 353. [Gubanov I. A., Kiselev K. V., Novikov V. S., Tihomirov V. N. *Bidens tripartite* L. Chereda trehrzadel'naja // V kn.: Illjustrirovannyj opredelitel' rastenij Srednej Rossii. T. 2. Pokrytosemennye (dvudol'nye: razdel'nolepestkovyje). [Bidens tripartite L. – Three-part sequence // In the book: Illustrated determinant of plants in Central Russia. T. 2. Angiosperms (dicotyledons: separate-petal).] М., 2004. P. 353.]
- Губанов И. А., Киселева К. В., Новиков В. С., Тихомиров В. Н. *Solidago Canadensis* L. – Золотарник канадский // В кн.: Иллюстрированный определитель растений Средней России. Т. 2. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестковые). М., 2004. С. 487. [Gubanov I. A., Kiselev K. V., Novikov V. S., Tihomirov V. N. *Solidago Canadensis* L. – Zolotarnik kanadskij // V kn.: Illjustrirovannyj opredelitel' rastenij Srednej Rossii. T. 2. Pokrytosemennye (dvudol'nye: razdel'nolepestkovyje). [Solidago Canadensis L. – Canadian Goldenrod // In the book: Illustrated determinant of plants in Central Russia. T. 2. Angiosperms (dicotyledons: separate-petal).] М., 2004. P. 487.]
- Сивак К. В., Лесиовская Е. Е., Ожигова М. Г., Хаким Эль Мабруки, Новикова Е. К. Непропротекторная и антифибротическая активность композиции экстрактов из надземных частей *agrimonia eupatoria* (rosaceae), *bidenst ripartita* и *solidago canadensis* (asteraceae) при токсических нефропатиях // Растительные ресурсы. 2017. № 53(2). С. 265–283. [Sivak K. V., Lesiovsckaja E. E., Ozhigova M. G., Hakim Jel' Mabruki, Novikova E. K. Nefroprotektornaja i antifibroticheskaja aktivnost' kompozicii ekstraktov iz nadzemnyh chastej agrimoniaeupatoria (rosaceae), bidenst tripartita i solidago canadensis (asteraceae) pri toksicheskikh nefropatijah // Rastitelnye resursy. 2017. №53(2). P. 265–283.]
- Новикова Е. К., Каухова И. Е. Production and standardization of extracts from *Bidens tripartite*, *Solidago Canadensis* and *Agrimonia eupatoria* // Clinical Pharmacology and Drug Therapy Reviews. 2017. V. 15. С. 27.

УДК 615.451.35.015.3

УПРАВЛЕНИЕ РИСКАМИ ДЛЯ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ САЛЬБУТАМОЛА В ФОРМЕ ДОЗИРОВАННЫХ АЭРОЗОЛЕЙ

Н. А. Ляпунов^{1*}, Е. П. Безуглая¹, В. А. Бовтенко¹, Ю. М. Столпер¹, В. Н. Баумер¹,
Е. Ю. Брылёва¹

Резюме. Исследованы и определены риски для таких функциональных характеристик аэрозолей сальбутамола для ингаляции, как однородность доставляемой дозы, распределение частиц сальбутамола на ступенях импактора Андерсена (прибора D) и респираторная фракция. Показано, что эти риски могут быть связаны с растворимостью сальбутамола сульфата (СС), составом препарата, содержанием воды в СС и этаноле, а также с распределением частиц СС по размерам. Показана связь между размерами частиц СС, скоростью их седиментации и функциональными характеристиками препарата. Исследованы свойства кристаллов СС и показана возможность наличия энантиомеров. Обсуждены риски, связанные с производственным процессом, материалами первичной упаковки и корректностью проведения процедур контроля качества. Показано, что использование баллонов из алюминиевого сплава EN AW-5052-0 без внутреннего покрытия не несёт риска выделения примесей металлов в препарат. Необоснованная замена насадок-ингаляторов может представлять риск для функциональных характеристик аэрозоля сальбутамола и его эквивалентности *in vitro* относительно референтного препарата.

Ключевые слова: сальбутамол, аэрозоль для ингаляции дозированных, функциональная характеристика, однородность доставляемой дозы, респираторная фракция, критический показатель качества, риск.

Об авторах: Н. А. Ляпунов – ORCID: 0000-0002-5036-8255;
Е. П. Безуглая – ORCID: 0000-0002-3629-7059;
В. А. Бовтенко – ORCID: 0000-0003-0895-6149;
Ю. М. Столпер – ORCID: 0000-0001-7652-7624;
В. Н. Баумер – ORCID: 0000-0003-4158-4981;
Е. Ю. Брылёва – ORCID: 0000-0002-8903-4922.

QUALITY RISK MANAGEMENT FOR SALBUTAMOL PRESSURIZED METERED DOSE INHALERS

N. A. Lyapunov^{1*}, E. P. Bezuglaya¹, V. A. Bovtenko¹, Yu. M. Stolper¹, V. N. Baumer¹, K. Yu. Bryleva¹

Abstract. The risks for the functional characteristics of Salbutamol pressurized metered dose inhaler (pMDI), such as the uniformity of delivered dose, the distribution of salbutamol particles at the stages of the Andersen impactor (apparatus D), and the respirable fraction, were studied and identified. It is shown that these risks can be associated with the solubility of salbutamol sulfate (SS), the formulation of pMDI, the water content in the SS and ethanol, as well as the particle size distribution of SS. A relationship is shown between the particle size distribution of the SS, the rate of their sedimentation and the performance characteristics of the preparation. The properties of SS crystals are investigated and the possibility of enantiomers presence is shown. The risks associated with the production process, the materials of the primary packaging and the correctness of the quality control procedures are discussed. It is shown that the use of containers made of aluminum alloy EN AW-5052-0 without internal coating does not pose the risk of the release of elemental impurities into the preparation. Unjustified replacement of actuators may pose a risk to the performance characteristics of Salbutamol pMDI and *in vitro* equivalence as compared with the reference medicinal product.

Keywords: salbutamol, pressurized metered dose inhaler, performance characteristic, uniformity of delivered dose, fine particle dose, critical quality attribute, risk.

Information about authors: N. A. Lyapunov – ORCID: 0000-0002-5036-8255;
E. P. Bezuglaya – ORCID: 0000-0002-3629-7059;
V. A. Bovtenko – ORCID: 0000-0003-0895-6149;
Yu. M. Stolper – ORCID: 0000-0001-7652-7624;
V. N. Baumer – ORCID: 0000-0003-4158-4981;
K. Yu. Bryleva – ORCID: 0000-0002-8903-4922.

¹ – Государственное научное учреждение «Институт монокристаллов» НАН Украины, 61072, Украина, г. Харьков, пр. Науки, 60

¹ – State Scientific Institution «Institute for Single Crystals» of the National Academy of Sciences of Ukraine, 60, Nauki ave., Kharkiv, 61072, Ukraine

* адресат для переписки:
E-mail: lyapunov.na@gmail.com
Тел.: +38 067 578 35 77

ВВЕДЕНИЕ

Сальбутамол – селективный агонист β_2 -адренорецепторов, который оказывает быстрое бронхолитическое действие и предназначен, в основном, для купирования приступов бронхиальной астмы (БА). При этом сальбутамол может также проявлять побочные эффекты, в частности, со стороны сердечно-сосудистой системы [1]. От надлежащего качества дозированных

аэрозолей сальбутамола для ингаляции зависит жизнь и здоровье больного БА.

Качество препарата закладывается на этапе фармацевтической разработки, подтверждается при трансфере технологии и обеспечивается при промышленном производстве [2]. При этом на первых двух этапах жизненного цикла аэрозоля для ингаляции необходимо провести оценку и предваритель-

ную валидацию процесса [3, 4], а при промышленном производстве следует применить чёткую систему мониторинга параметров процесса и контроля качества препарата [2]. При фармацевтической разработке аэрозолей для ингаляций (особенно суспензионных) применяется системный подход [3, 5], основанный на надёжных научных данных и управлении рисками для качества [6], что обусловлено исключительной важностью этих препаратов для больных БА.

Риски для качества аэрозолей для ингаляции могут быть обусловлены составом препарата, свойствами лекарственных и вспомогательных веществ, материалами первичной упаковки (баллон, дозирующий клапан, насадка-ингалятор и спейсер, при его наличии), взаимодействием препарата с материалами упаковки, параметрами производственного процесса, корректностью процедур контроля качества, а также условиями хранения лекарственного вещества и препарата. Вероятность возникновения рисков может быть малой, средней и высокой. Ошибки, приводящие к браку, зависят от научного уровня и методологии разработки [3, 5], а также от соблюдения правил GMP [7]. Поэтому вероятность проявления рисков может отличаться на разных предприятиях.

Препараты сальбутамола в форме дозированных аэрозолей для ингаляции содержат микронизированную субстанцию сальбутамола сульфата (СС), которая находится в баллоне в виде суспензии [1]. Физико-химические свойства СС и физические свойства суспензии необходимо учитывать при общей оценке рисков.

Ранее были опубликованы результаты исследований, демонстрирующие эквивалентность *in vitro* разработанного препарата *Сальбутамол аэрозоль* для ингаляций дозированный 100 мкг/доза и препарата *Сальбутамол-Тева аэрозоль* для ингаляций дозированный 100 мкг/доза [8]. Цель данной статьи – продемонстрировать влияние разных критических факторов на эквивалентность *in vitro* и качество аэрозолей сальбутамола для ингаляции, чтобы снизить возможные риски при их разработке, трансфере технологии и промышленном производстве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали микронизированные субстанции СС, которые соответствовали требованиям монографии «Salbutamol sulfate» Европейской фармакопеи [9] и были поставлены тремя производителями. Исследовали лабораторные образцы препарата *Сальбутамол аэрозоль* для ингаляции дозированный 100 мкг/доза [8], которые содержали одну из указанных субстанций СС в виде суспензии в количестве 100 мкг в номинальной дозе (в пересчёте на 100% сухое вещество сальбутамол), этанол безводный и норфлуран [9]. Для изготовления образцов использовали клапаны с объёмом дозирующей камеры 25 мкл. Объектом исследований

служили также образцы опытной серии 10317 этого препарата, произведённой с использованием одной из субстанций СС.

Для сравнительных исследований использовали также препарат *Вентолин™ Эвохалер™* аэрозоль для ингаляции дозированный 100 мкг/доза (Глаксо Вэлком Продакшн, Франция; с. С95А, годен до 02.2020) [1] и лабораторные образцы двух аэрозолей сальбутамола, один из которых содержит этанол (96 %) и норфлуран, а другой – этанол (96%), олеиловый спирт и норфлуран [10]. Для изготовления этих образцов использовали клапаны с объёмом дозирующей камеры 50 мкл.

Объектами исследований были насадки-ингаляторы (актуаторы) с диаметром сопла 0,25 мм двух производителей и алюминиевые баллоны без внутреннего покрытия.

Распределение частиц по размерам СС определяли методом лазерной дифракции [9] на лазерном дифракционном анализаторе частиц «Shimadzu SALD-2201» («Shimadzu», Япония). Для приготовления суспензий использовали этанол безводный, в котором СС практически не растворим [9]. Методом лазерной дифракции определяли также распределение частиц СС по размерам в дозах препарата, которые выпускали с помощью актуатора в среду этанола безводного. Размер частиц определяли также методом оптической микроскопии [9] с помощью микроскопа с окуляр-микрометром «Krüss MBL 2100» («A. Krüss Optronik», Германия).

Кинетику седиментации суспензий СС в этаноле безводном определяли с помощью седиментационных аналитических весов CRYSTAL 200 («Gibertini S.A.», Италия). Содержание этанола (% об/об) находили по алкоголеметрическим таблицам [9], предварительно определяя плотность этанола при температуре 20 °С с помощью денситометра DMA 500 («Anton Paar», Австрия).

Качество СС контролировали по монографии «Salbutamol sulfate» [9] и исследовали методом рентгеновской дифракции порошка (РДП) [9]. Рентгенофазовый анализ проводили на порошковом дифрактометре «Siemens D500» («Siemens», Германия) в отфильтрованном медном излучении ($\lambda=1,54184\text{Å}$, графитовый монохроматор на вторичном пучке, геометрия Брегга-Брентано) при температуре ~20 °С в режиме шагового сканирования в интервале углов $2^\circ \leq 2\theta \leq 60^\circ$, шаг сканирования 0,02°. Расчёт рентгенограмм проводили по методу Ритвельда (программа FullProf [11]).

Сальбутамол определяли методом ВЭЖХ по валидированной методике [10] на хроматографе Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D («Shimadzu», Япония).

Распределение частиц сальбутамола на ступенях прибора D определяли в соответствии с общей статьёй 2.9.18 Европейской фармакопеи [9]. Ламинарный поток воздуха создавали вакуумным насосом ERWEKA

Vacuum Pump Type VP 1000, снабжённым измерителем скорости потока DFM 2 («Erweka», Германия). Средние аэродинамические диаметры массы (MMAD) рассчитывали по графикам зависимости относительного количества сальбутамола (относительно величины осаждённой суммарной фракции), прошедшего ступени прибора D, от эффективного размера частиц, осевших на этих ступенях [5, 12]. Геометрические стандартные отклонения (GSD) рассчитывали с помощью этих же графиков по формуле [5]:

$$GSD=(D84,13\% / D15,87\%)^{1/2}.$$

Однородность доставляемой дозы (ОДД) определяли в соответствии с общей статьёй «Preparations for Inhalation» Европейской фармакопеи [9] с использованием устройства для сбора дозы ERWEKA DUSA-MDI, вакуумного насоса ERWEKA HVP 1000 и расходомера типа DMF 2 («Erweka», Германия).

Содержание примесей металлов, выделившихся в препарат после двух лет его хранения при температуре 25 ± 2 °С, определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой [9] на атомно-эмиссионном спектрометре iCAP 6300 Duo («ThermoFisher Scientific», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Риски, связанные с составом препарата, свойствами сальбутамола сульфата и вспомогательных веществ

При фармацевтической разработке следует определить и изучить физико-химические свойства лекарственных и вспомогательных веществ, которые могут влиять на функциональные характеристики лекарственного препарата [3]. Для СС к таким свойствам следует отнести растворимость, содержание воды, размер частиц и свойства кристаллов [3]. Для анализа рисков необходимо, во-первых, исследовать эти физико-химические свойства и, во-вторых, определить их влияние на такие функциональные характеристики аэрозолей для ингаляции, как ОДД, респирательная фракция, профиль распределения частиц сальбутамола на ступенях прибора D и профиль прохождения ими ступеней прибора D [5, 9].

Растворимость СС и состав вспомогательных веществ. СС – гидрофильное вещество, которое практически не растворимо в норфлуране (НFC 134a) и легко растворимо в воде [9], поэтому его растворимость в этаноле возрастает с увеличением содержания воды, а также с повышением температуры. В этаноле безводном, содержащем 99,8% (об/об) этанола, при температурах 25 °С и 40 °С растворяется 91 мкг/мл и 115 мкг/мл СС соответственно. В этаноле (96%), содержащем 95,1% (об/об) этанола, при температурах 25 °С и 40 °С растворяется соответственно 377 мкг/мл и

1253 мкг/мл СС, то есть, больше чем в этаноле безводном в 4,1 и 10,9 раза. При смешивании суспензии СС в этаноле с норфлураном часть растворившегося в этаноле СС будет кристаллизоваться. Неуправляемая кристаллизация и перекристаллизация – факторы риска. Поэтому в аэрозолях сальбутамола рационально использовать этанол безводный в возможно минимальной концентрации, готовить суспензию при пониженной температуре и избегать перепадов температуры при хранении препарата.

Технологии однократного и двойного наполнения под давлением дают возможность производить аэрозоли сальбутамола на основе норфлурана без этанола [13]. Однако отсутствие в препарате этанола создаёт другие риски для ОДД [10] и респирательной фракции (рисунок 1).

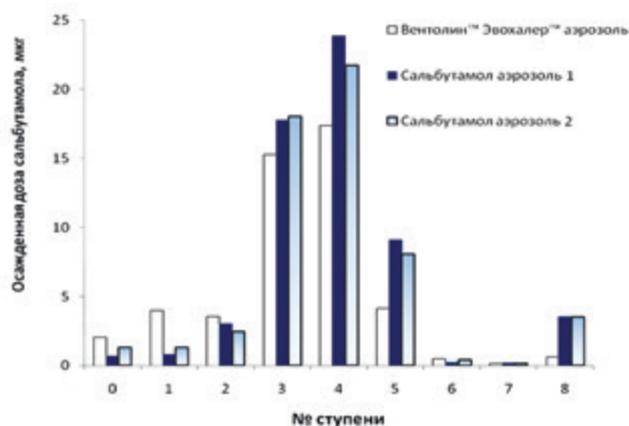


Рисунок 1. Профиль осаждения сальбутамола на ступенях прибора D: 1 – препарат Вентолин™ Эвохалер™ аэрозоль для ингаляций 100 мкг/доза; 2 – препарат Сальбутамол аэрозоль для ингаляций 100 мкг/доза, содержащий этанол (96%); 3 – препарат Сальбутамол аэрозоль для ингаляций 100 мкг/доза, содержащий этанол (96%), олеиловый спирт

Для препарата Вентолин™ Эвохалер™, не содержащего этанол, суммарная масса мелкодисперсных частиц сальбутамола, осаждаемая на ступенях 3–8, составляет 38,0 мкг и оказывается меньше, чем его респирательная фракция 54,7 мкг для препарата № 2, содержащего в одной дозе 1,36 мг этанола (96%) (рисунок 1). Поскольку распределение по размерам частиц СС в обоих препаратах практически идентично (рисунок 2), можно утверждать, что большая респирательная фракция СС обусловлена присутствием в составе этанола.

Увеличение содержания этанола (96%) до 2,02 мг/доза и дополнительное введение в состав препарата липофильного поверхностно-активного вещества (ПАВ) олеилового спирта (0,0625 мг/доза) практически не повлияло на профиль осаждения сальбутамола на ступенях прибора D и респирательную фракцию, которая составила 51,9 мкг. Однако более высокое содержание этанола в дозе может приводить к

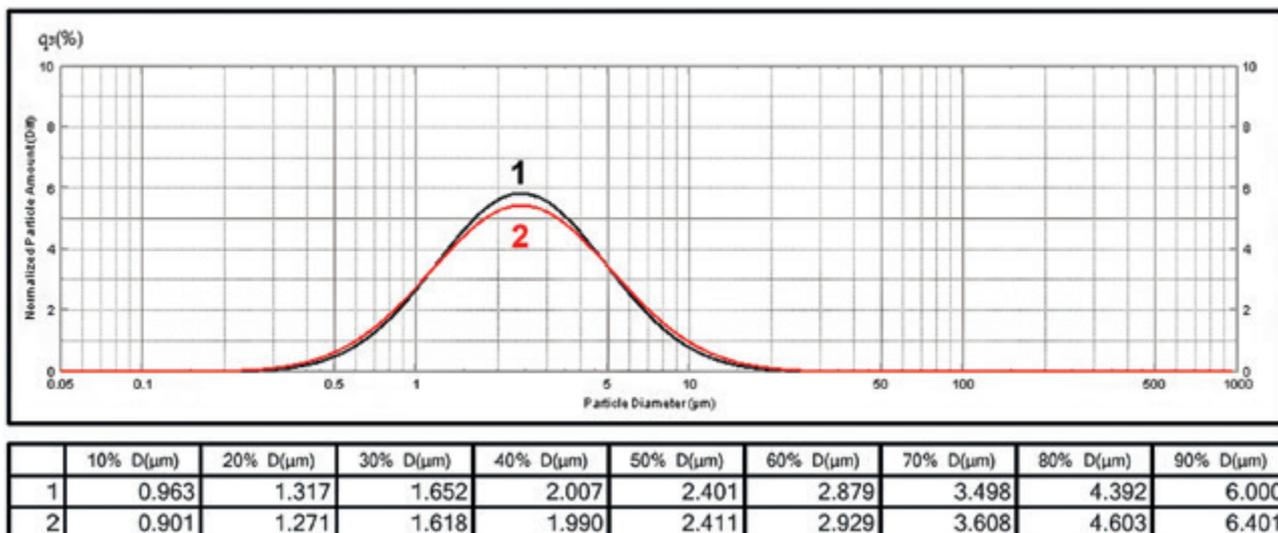


Рисунок 2. Распределение по размерам частиц СС в препарате Вентолин™ Эвохалер™ аэрозоль (1) и Сальбутамол аэрозоль (2)

уменьшению респираторной фракции сальбутамола [14]. Введение в состав препарата гидрофильного ПАВ полисорбата 80 оказалось критическим фактором для его аэродинамических свойств, что связано с агрегацией частиц СС в этаноле (96%) под влиянием этого ПАВ (рисунок 3).

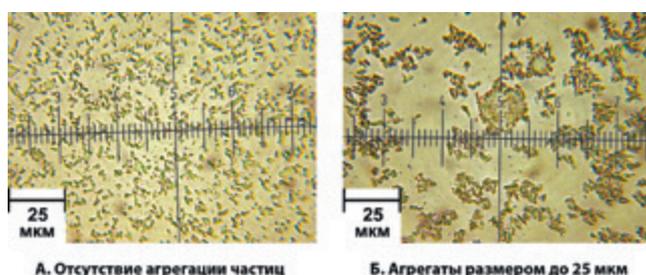


Рисунок 3. Микрофотографии суспензий СС микронизированного: А - в этаноле (96%); Б - в этаноле (96%) в присутствии полисорбата 80

Содержание воды. Критическим фактором для дозы мелкодисперсных частиц является повышенное содержание воды в субстанции СС и в этаноле [15]. При содержании в этаноле 6,5–7,5% (об/об) воды происходит флокуляция частиц гидрофильного СС в жидкой среде гидрофобного норфлурана и респираторная фракция сальбутамола резко уменьшается. Риск для респираторной фракции сальбутамола также создаёт примесь воды в норфлуране.

Размер частиц СС. Как правило, в микронизированных субстанциях для изготовления аэрозолей для ингаляции в виде суспензий не менее 95% частиц должны быть размером ≤5 мкм, а не менее 99% частиц ≤10 мкм [5]. На рисунке 4 представлено распределение частиц по размерам в порошках СС двух производителей. Проба субстанции № 1 была отобрана из верх-

ней части контейнера. Как видно из рисунка 4, в субстанции № 1 50% частиц имели диаметр ≤2,167 мкм, а 90% – ≤4,376 мкм; при этом 93,744% частиц имели размер ≤4,936 мкм, 99,812% частиц – ≤10,231 мкм, а максимальный размер частиц составил 21,210 мкм.

В субстанции № 2 50% частиц имели диаметр ≤4,850 мкм, а 90% частиц – ≤13,928 мкм; размеры лишь 82,003% – ≤10,231 мкм, а максимальный размер частиц составил 170,259 мкм.

Субстанции СС двух производителей существенно отличаются по размерам частиц (рисунок 4). Если субстанция № 1 практически соответствует установленным критериям приемлемости, то субстанция № 2 не пригодна для изготовления аэрозоля сальбутамола, хотя была предложена её производителем именно для этих целей.

Были изготовлены лабораторные образцы аэрозоля сальбутамола с субстанциями № 1 и 2, содержащие 1,9 мг/доза этанола безводного. На рисунке 5 представлены профили осаждения сальбутамола на ступенях прибора D, а на рисунке 6 профили прохождения частицами сальбутамола ступеней прибора D, полученные при исследовании изготовленных образцов.

Как следует из рисунков 5 и 6, профили осаждения частиц сальбутамола на ступенях прибора D и профили прохождения ими ступеней прибора D для двух препаратов, имеющих одинаковый состав и материалы упаковки, существенно отличаются, что обусловлено разным размером частиц СС. Суммарные количества мелкодисперсных частиц, осевшие на ступенях 3–8 прибора D, для препарата с сальбутамолом № 1 и препарата с сальбутамолом № 2 составили 54,68 мкг и 20,11 мкг соответственно, что в первом случае превышает в 1,6 раза нижний предел приемле-

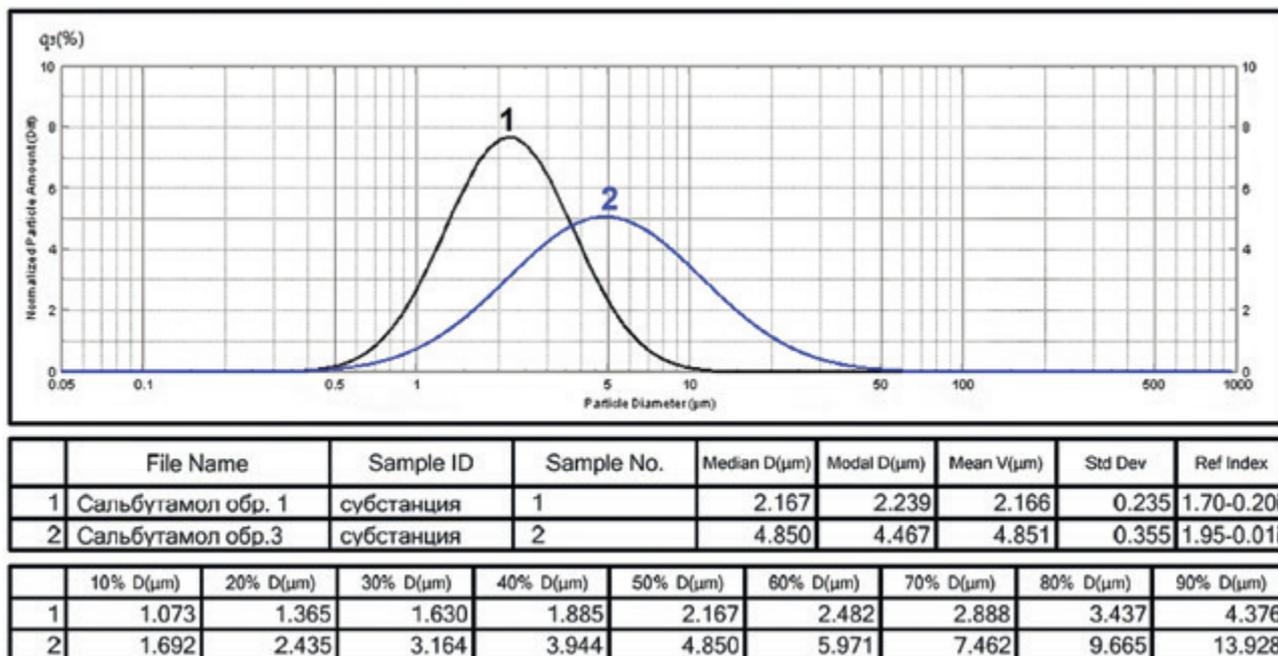


Рисунок 4. Распределение частиц по размерам в субстанциях СС разных производителей

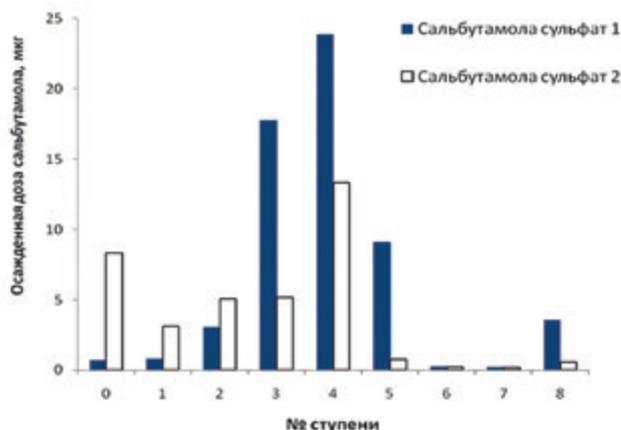


Рисунок 5. Профили осаждения сальбутамола на ступенях прибора D

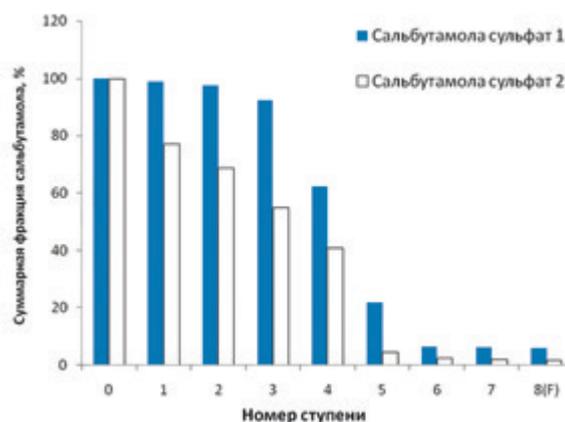


Рисунок 6. Профили прохождения сальбутамолом ступеней прибора D

мости ≥ 35 мкг [16], а во втором случае оказывается в 1,7 раза меньше этого предела. Для образцов препаратов с субстанциями № 1 и № 2 величины MMAD отличаются в 1,5 раза (2,9 мкм и 4,3 мкм), а значения GSD в 1,3 раза (1,57 и 2,03). Суммарная фракция крупных частиц сальбутамола, которые осаждаются внутри пресеппаратора и на ступенях 0, 1 и 2 прибора D, для препаратов с субстанциями № 1 и № 2 составили соответственно 30,65 мкг и 54,68 мкг. Эти частицы при вдохе оседают во рту и глотке [17] и при проглатывании могут обуславливать системные побочные эффекты [18].

Размер частиц СС – критический фактор для аэродинамических свойств препарата и соответственно эффективности его терапевтического действия и безопасности. Нормы распределения частиц по размерам

СС и методика их определения методом лазерной дифракции должны быть стандартизованы.

Суспензиям свойственна седиментационная неустойчивость. Скорость седиментации частиц дисперсной фазы суспензии описывается формулой Стокса:

$$u = 2 \cdot g \cdot (\rho - \rho_0) \cdot r^2 / 9 \cdot \eta, \quad (1)$$

где u – скорость седиментации частиц дисперсной фазы; $(\rho - \rho_0)$ – разница в плотности дисперсной фазы и дисперсионной среды; η – динамическая вязкость дисперсионной среды; r – радиус частиц дисперсной фазы.

По формуле Стокса скорость седиментации возрастает с увеличением размера частиц СС прямо пропорционально квадрату радиуса и оказывается тем

больше, чем меньше вязкость дисперсионной среды. На рисунке 7А представлена кинетика седиментации частиц субстанций СС № 1 и 2 в этаноле безводном.

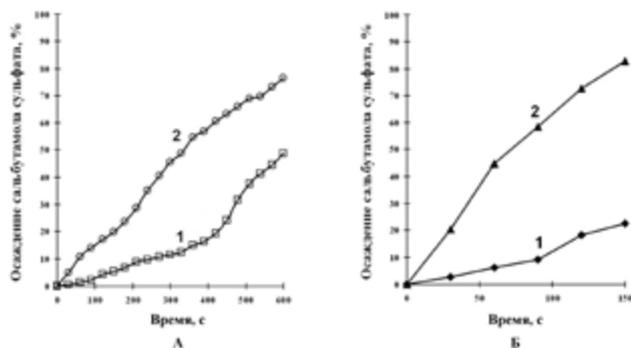


Рисунок 7. Кинетика седиментации субстанций СС № 1 и № 2 в этаноле безводном (А) (экспериментальные данные) и в смеси этанола с норфлураном (Б) (расчётные данные)

Как видно из рисунка 7А, в этаноле безводном микронизированная субстанция № 1 оседает медленно, а субстанция № 2 – гораздо быстрее, что представляет риск для однородности дозирования СС в виде суспензии в аэрозольные баллоны в ходе производственного процесса даже при её постоянном перемешивании и рециркуляции. Возникает также риск, связанный с тем, что в процессе дозирования суспензии в разные баллоны будут попадать фракции СС, отличающиеся по размеру частиц, что может обусловить несоответствие по показателю «Однородность доставляемой дозы».

При определении ОДД отрезок времени между встряхиванием баллона и выдачей дозы в устройство для сбора дозы [9] составляет около 30 с. В этаноле безводном за 30 с оседает 0,63% суспендированной субстанции № 1 и 4,85% субстанции № 2. При температуре 25 °С плотность этанола безводного 0,7852 г/см³, а динамическая вязкость – 1,096 мПа·с; плотность норфлурана в сжиженном состоянии в баллоне 1,206 г/см³, а динамическая вязкость – 0,202 мПа·с. При расчёте аддитивных величин плотности и динамической вязкости смешанного растворителя *этанол – норфлуран*, который является дисперсионной средой препарата, они соответственно составили 1,1785 г/см³ и 0,26 мПа·с. Т. е., динамическая вязкость дисперсионной среды определяется, главным образом, норфлураном и оказывается меньше динамической вязкости этанола безводного в 4,2 раза. Поэтому в баллоне крупные частицы СС должны оседать приблизительно в 4,2 раза быстрее, чем в этаноле безводном, как это показано на рисунке 7. В среде смешанного растворителя *этанол – норфлуран* к отверстиям дозирующей камеры клапана за 30 с могут осесть частицы сальбутамола в количестве 2,65% от его общей массы в баллоне в случае использования субстанции № 1 и 20,41% – в

случае субстанции № 2. Наличие большого количества крупных частиц в субстанции № 1 (от 10 мкм до 21 мкм), попавших в отдельные баллоны, может привести к их быстрому оседанию и, соответственно, к более высокому содержанию сальбутамола в первых трёх доставляемых дозах при испытании ОДД. При использовании субстанции № 2 этот риск намного больше, и такое явление может наблюдаться для всех баллонов.

Для образцов опытной серии 10317 препарата *Сальбутамол аэрозоль*, изготовленной с СС № 1, моделируя условия теста «Однородность доставляемой дозы», из баллона выпустили 2 технические дозы для заполнения препаратом дозирующей камеры клапана, а затем после встряхивания в течение 5 с и интервала 10 с (перед выпуском каждой дозы) в среду этанола безводного выпустили дозы № 1-3 (образец 1), дозы № 4-6 (образец 2), дозы № 7-9 (образец 3). На рисунках 8 и 9 представлено распределение по размерам частиц СС в таких трёх образцах, полученных для двух разных баллонов препарата с. 10317.

Таким образом, в одних баллонах отличие в распределении частиц по размерам СС в дозах 1-3, 4-6 и 5-7 было минимальным (рисунок 8), а в других баллонах размеры частиц СС в первых 3-х дозах не соответствовали критериям приемлемости (рисунок 9, кривая 1). Размеры ≤4,936 мкм и ≤10,231 мкм имели только 61,370% и 83,296% частиц соответственно, а размеры от 10,231 мкм до 391,689 мкм – около 17% частиц. В дозах 4-6 и 5-7 распределение частиц по размерам соответствовало таковому в баллоне № 1 (рисунки 8 и 9) и оставалось приблизительно одинаковым до 198-200-й доз.

Результаты исследований свидетельствуют, что процесс дозирования суспензии не был должным образом валидирован, и в часть баллонов попало достаточно большое количество крупных частиц СС, которые очень быстро (в течение 10 с) после встряхивания оседали и попадали в первые три дозы препарата. То есть, очень крупные частицы присутствовали только в первых трёх дозах, а не во всем объёме препарата, что свидетельствует о наличии крупных частиц в порошке, а не об их агрегации в препарате (см. рисунок 3Б).

Следует также отметить, что распределение частиц по размерам в пробе субстанции № 1 (рисунок 4), отобранной из верхнего слоя порошка в контейнере, практически идентично распределению частиц по размерам в дозах препарата 1-9 (рисунок 8) и в дозах 4-9 (рисунок 9, кривые 2 и 3), отобранных из баллонов № 1 и № 2, и существенно отличается в дозах 1-3, отобранных из баллона № 2 (рисунок 9, кривая 1). Если в отобранной пробе субстанции № 1, из которой была изготовлена серия 10317, максимальный размер частиц составил 21,210 мкм, то в дозах 1-3 – 391,689 мкм. Это свидетельствует о расслоении порошка СС в кон-

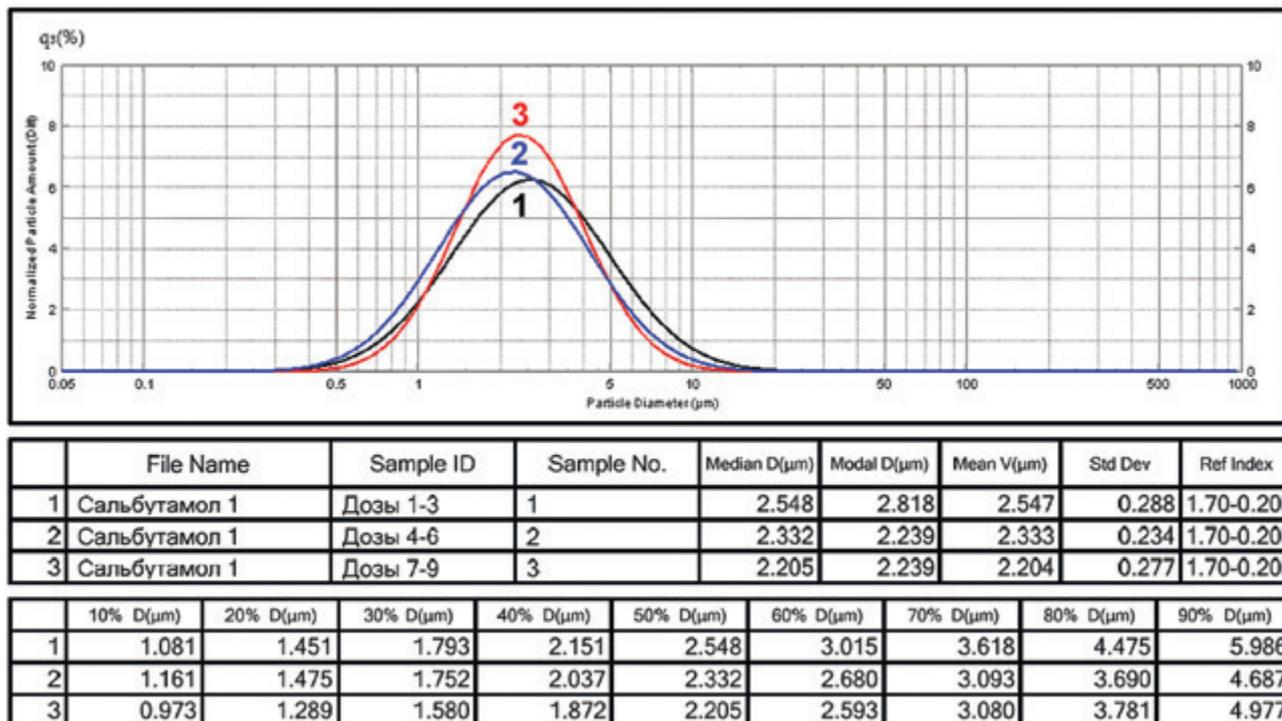


Рисунок 8. Распределение по размерам частиц СС в дозах, последовательно отобранных из баллона № 1 через 10 с после его встряхивания: 1–3 дозы (1), 4–6 дозы (2), 7–9 дозы (3)

тейнере при хранении и оседании в нижние слои более крупных частиц, которых не оказалось в пробе из верхнего слоя. Поэтому для входного контроля размера частиц следует разработать корректный порядок отбора средней пробы.

Исследовали влияние крупных частиц сальбутамола в первых 3-х доставляемых дозах на показатель «Однородность доставляемой дозы». Репрезентативные результаты исследований ОДД для баллонов № 3 и 4 представлены в таблице 1.

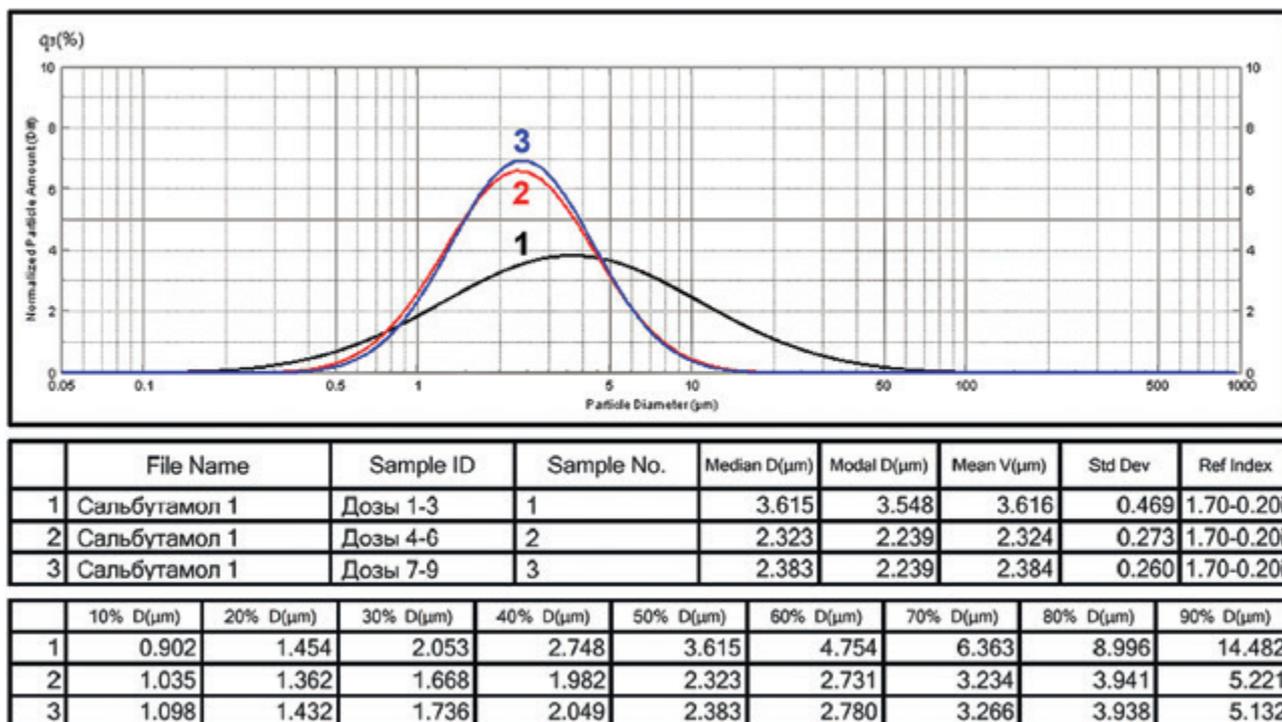


Рисунок 9. Распределение по размерам частиц СС в дозах, последовательно отобранных из баллона № 2 через 10 с после его встряхивания: 1–3 дозы (1), 4–6 дозы (2), 7–9 дозы (3)

Таблица 1.

Однородность доставляемой дозы (ДД) сальбутамола для образцов препарата Сальбутамол аэрозоль для ингаляции дозированный 100 мкг/доза (с. 10317)

№ пп	№ дозы	Влияние распределения частиц по размерам				Влияние режима герметизации (провокационные испытания)			
		Баллон № 3		Баллон № 4		Баллон № 5		Баллон № 6	
		ДД, мкг	Δ, %	ДД, мкг	Δ, %	ДД, мкг	Δ, %	ДД, мкг	Δ, %
1	1	76,39	-7,96	117,91	+28,91	92,82	+4,36	120,71	+46,55
2	2	79,31	-4,44	110,58	+20,89	94,50	+6,25	112,30	+36,34
3	3	79,23	-4,54	111,94	+22,38	113,43	+27,53	121,07	+46,99
4	99	95,53	+15,10	86,06	-5,91	88,36	-0,66	68,83	-16,43
5	100	75,01	-9,62	84,59	-7,52	98,22	+10,43	75,77	-8,01
6	101	82,44	-0,67	80,97	-11,48	94,44	+6,18	80,80	-1,90
7	102	84,82	+2,20	83,62	-8,58	95,26	+7,10	76,04	-7,68
8	198	83,74	+0,90	80,53	-11,96	101,86	+14,52	88,69	+7,68
9	199	89,03	+7,27	82,41	-9,90	84,12	-5,42	70,64	-14,24
10	200	84,44	+1,74	76,09	-16,81	26,44	-70,27	8,80	-89,32
Среднее		82,99		91,47		88,95		82,37	
RSD		7,35		16,98		26,23		39,91	
КО, мкг/доза		107,23		106,54		112,71		118,27	

Примечание. Первые две технические дозы не учитываются. Δ – отклонение от средней величины ДД. КО – результаты количественного определения сальбутамола в отмеренной дозе.

Согласно требованиям общей статье «Preparations for Inhalation» [9], содержание сальбутамола в одной ДД препарата для 9 из 10 результатов должно быть в пределах от 75% до 125% от среднего значения ДД, а во всех ДД – в пределах от 65% до 135%.

Как следует из таблицы 1, ОДД в баллоне № 3 соответствует установленным требованиям и находится на приемлемом уровне ($RSD=7,35$). Однако в серии препарата 10317 были обнаружены баллоны, для которых

в первых 3-х ДД содержание сальбутамола оказалось высоким, хотя и не превысило установленных критериев приемлемости (баллон № 4) (таблица 1). В эти баллоны, видимо, попали крупные фракции частиц СС, что негативно повлияло на ОДД сальбутамола ($RSD=16,98$). То есть, наличие частиц размером более 10 мкм в микронизированном порошке СС – критический фактор, от которого зависит такая функциональная характеристика препарата, как ОДД.

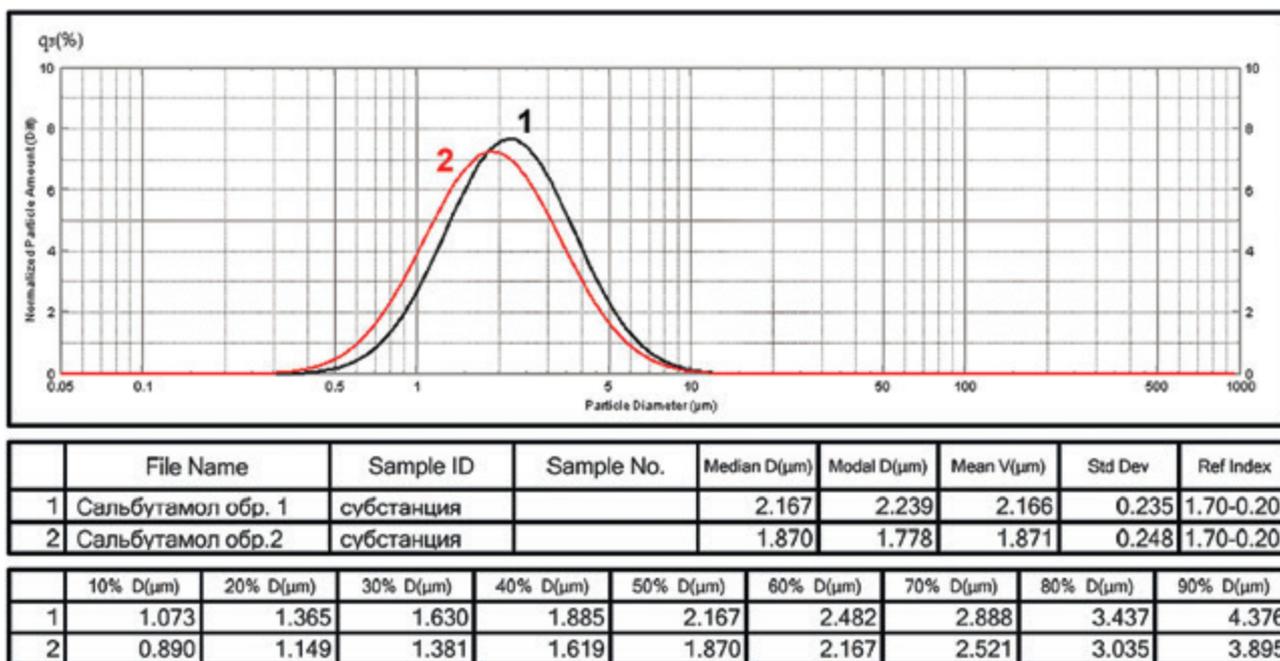


Рисунок 10. Распределение по размерам частиц СС в субстанциях двух производителей

Свойства кристаллов СС. В монографии «Salbutamol Sulfate» [9] указано, что СС может содержать энантимеры, содержание которых не нормируется, а методика их определения отсутствует. Поэтому методом РДП были исследованы микронизированные порошки СС двух производителей. Эти субстанции соответствовали требованиям монографии «Salbutamol Sulfate» [9] и нормам в отношении размера частиц (рисунок 10).

В базе данных Cambridge Structural Database (Version 5.39, updated February 2018) [19] имеются данные о кристаллическом строении СС, кристаллизующегося в моноклинной сингонии, пространственная группа Сс, полученные методом РДП (таблица 2). На рисунке 11 представлены рентгенограммы исследуемых образцов СС, а на рисунке 12 – результаты уточ-

нения рентгенограмм обеих субстанций СС по методу Ритвельда.

На рентгенограмме субстанции № 1 нет линий, обусловленных примесями, а результаты уточнения по методу Ритвельда хорошо согласуются с данными литературы о кристаллической структуре СС (таблица 2, рисунки 11А и 12А).

Для субстанции № 2 результаты уточнения по методу Ритвельда оказались несколько хуже. Во-первых, по сравнению с данными литературы и результатами, полученными для субстанции № 1 параметры элементарной ячейки, в частности, параметр *a*, заметно увеличены (таблица 2); во-вторых, на рентгенограмме субстанции № 2 наблюдаются малоинтенсивные пики, не соответствующие кристаллической структуре

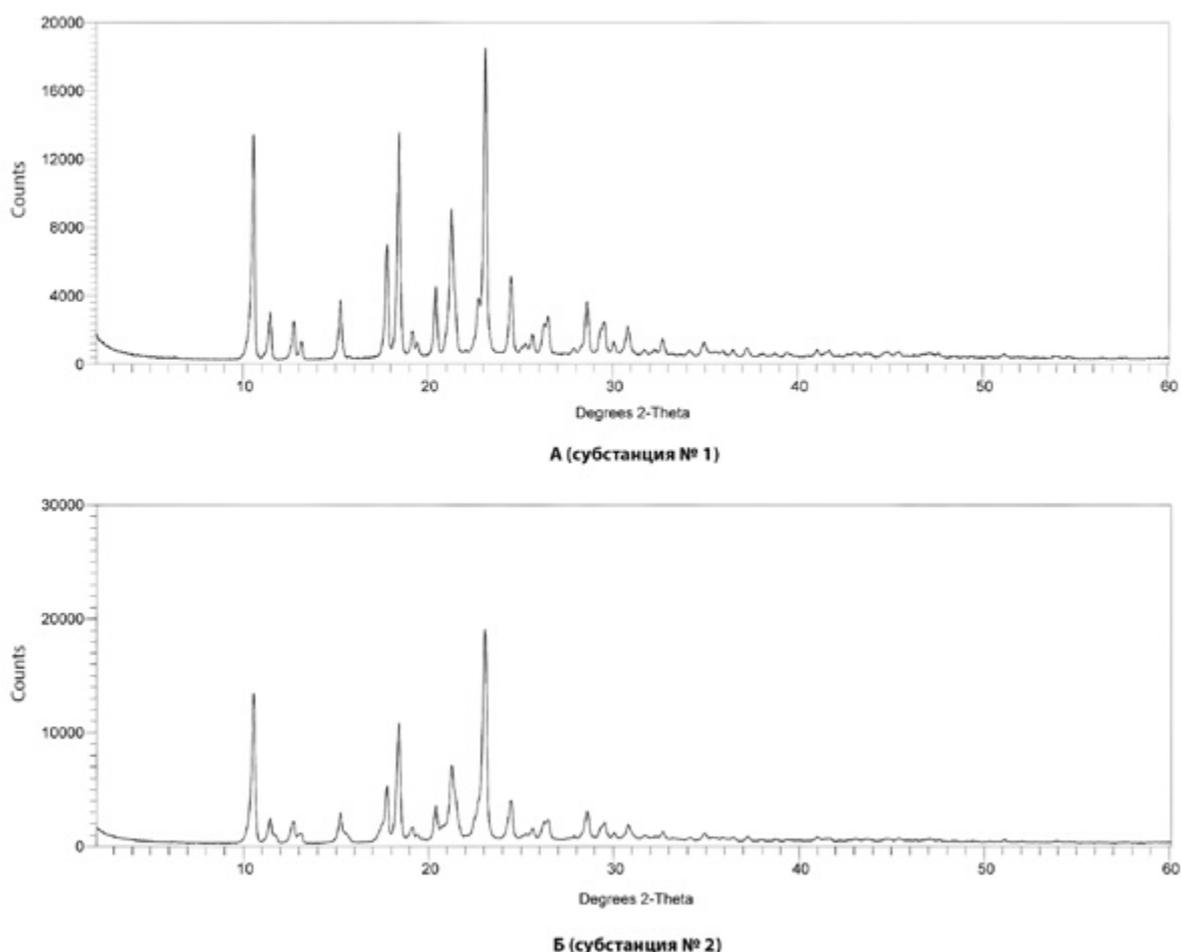


Рисунок 11. Рентгенограммы салбутамола сульфата двух производителей

Таблица 2.

Данные литературы о параметрах кристаллической решётки CCDC=SALBUTO2 и расчётные параметры решётки СС

Образец	Пр. гр.	a, Å	b, Å	c, Å	α, °	β, °	γ, °
CCDC=SALBUTO2	Сс	28,06986(10)	6,186384(26)	16,92605(5)	90	81,1328(3)	90
Субстанция № 1	Сс	28,0912(8)	61,19241(16)	16,9310(4)	90	81,1489(15)	90
Субстанция № 2	Сс	28,144(2)	6,1994(5)	16,9523(13)	90	81,369(5)	90

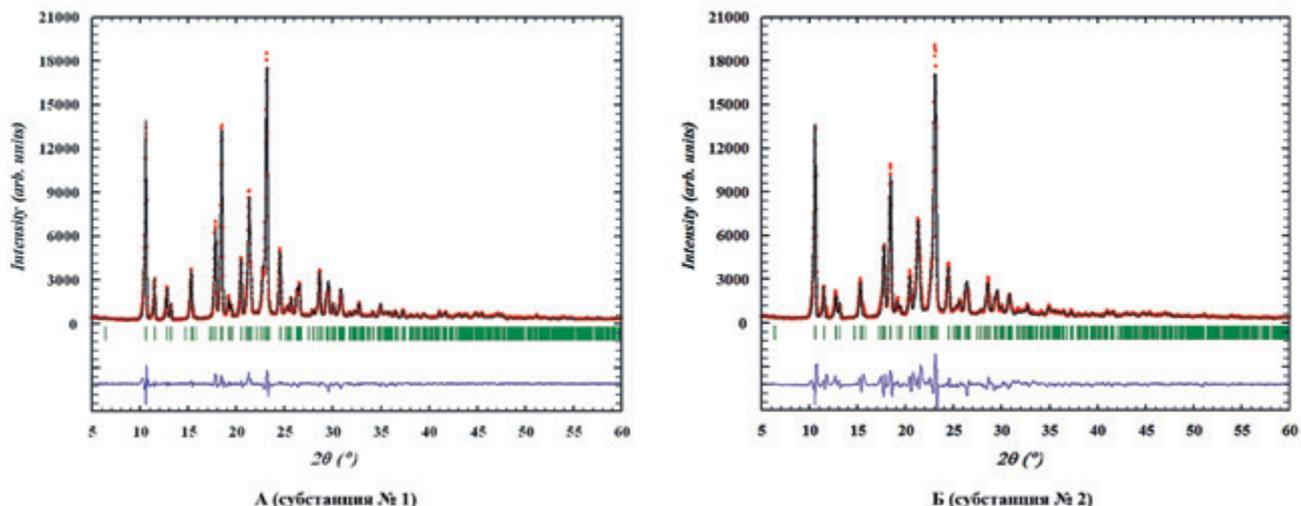


Рисунок 12. Результаты уточнения рентгенограммы субстанций СС № 1 и № 2 по методу Ритвельда.

Примечание. Приведены наложенные друг на друга рентгенограммы, полученные экспериментально (красный цвет) и вычислением (чёрный цвет); ряд вертикальных штрихов показывают положения дифракционных максимумов; разница между экспериментальными и вычисленными значениями интенсивности в каждой точке показана на нижней кривой

СС (рисунки 12Б и 13) и свидетельствующие о наличии ~2–3 масс.% примеси. Эта примесь входит в кристаллическую решётку субстанции № 2, вызывая в ней изменение параметров и заметные микронапряжения. Содержание сопутствующих примесей в субстанциях № 1 и 2 оказалось ниже учитываемого предела 0,05%, их суммарное содержание не превышало 0,05% и 0,10%, а количественное содержание основного вещества составляло 100,1% и 100,0% соответственно, что соответствует требованиям монографии «Salbutamol Sulfate» [9].

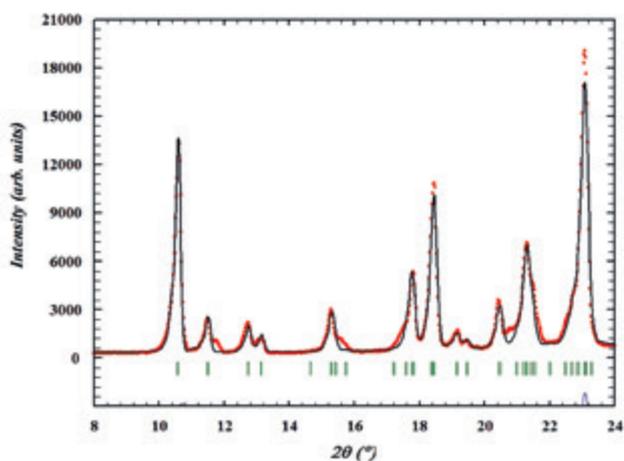


Рисунок 13. Малоугловая область рентгенограммы субстанции СС № 2.

Примечание. Видны посторонние пики, для которых нет пиков, соответствующих структурной модели

Искажение параметров решётки субстанции № 2, видимо, обусловлено примесью энантиомера, которая количественно определяется как салбутамол и не

учитывается при оценке качества СС. Влияние примеси энантиомера на эффективность и безопасность СС данного производителя, видимо, должно стать предметом научных исследований, а при выборе производителей СС следует учитывать не только результаты аналитических исследований в соответствии с фармакопейными требованиями, но и данные рентгеноструктурного анализа.

Риски, связанные с производством

При абсорбции влаги из воздуха частицы СС образуют агломераты и субстанция становится непригодной для производства аэрозолей для ингаляции. Поэтому хранить её необходимо в герметично закрытой упаковке, а при промышленном производстве целесообразно получать субстанцию в упаковке такого размера, который позволял бы полностью использовать субстанцию из вскрытой упаковки для производства одной серии.

На протяжении всего производственного процесса необходимо обеспечивать однородность распределения в спиртовой суспензии частиц СС, а при дозировании во флаконы – точность массы каждой дозы суспензии и норфлурана. Необходимо провести предварительную валидацию процесса [4] и при серийном производстве осуществлять его постоянный мониторинг [7].

Следует отметить ещё один серьёзный риск, связанный с используемыми компонентами первичной упаковки. У дозирующих клапанов разных производителей одинаковый диаметр алюминиевой капсулы, но они имеют свои конструкционные особенности. Например, высота стенки капсулы клапанов разных

производителей составляла от 6,6 мм до 8,2 мм, а глубина посадочного места под горловину баллона – от 4,6 мм до 5,9 мм; у них была разная длина и толщина штоков и т.д. Поэтому технологическая линия должна быть укомплектована соответствующими узлами для герметизации баллонов каждым видом клапанов. Параметры процесса герметизации также должны быть обоснованы для каждого вида клапанов. В противном случае существует большая вероятность риска микроразрушений клапана и неудовлетворительной герметизации баллонов.

Так, при герметизации баллонов с препаратом на соответствующем оборудовании клапанами № 1 максимальная потеря в массе баллонов из расчёта за 1 год составила 78,9 мг, что соответствовало 1,08% или 2,7 дозам, которые были учтены при обосновании избытка препарата при наполнении баллона (минимального наполнения) [5]. При исследованиях «наихудший случай» (провокационных исследованиях), заключающихся в герметизации баллонов с препаратом высококачественными, но отличающимися конструктивно клапанами № 2 на неадаптированном оборудовании и при необоснованных технологических режимах утечка составила около 365 мг/год, что соответствовало приблизительно 35 дозам и, соответственно, 70 дозам за 2 года. При испытании на ОДД из-за большой утечки препарата после 1 года хранения оставшегося количества было недостаточно для выдачи 200 полноценных доз из некоторых баллонов, несмотря на предусмотренный избыток 50 доз. В репрезентативных баллонах № 5 и 6 доставляемые дозы под номером 200 были соответственно на 70,27% и 89,32% меньше средней величины ДД (таблица 1). Кроме того, в баллон № 6 из-за недостаточного обеспечения однородности суспензии при её дозировании попало значительное количество крупной фракции СС, что привело к высокому содержанию сальбутамола в первых 3-х дозах и несоответствию критериям приемлемости по данному тесту (RSD с 7,35% в случае баллона № 3 возросло до 39,91% в случае баллона № 6) (таблица 1).

Согласно ОФС.1.4.1.0002.15 «Аэрозоли и спреи» [20], если масса содержимого упаковки менее 15 г, средняя скорость утечки для 12 упаковок не должна превышать 525 мг/год и ни для одной из них – 750 мг/год. Если хотя бы для одной упаковки скорость утечки превышает 750 мг/год (но не более 1,1 г/год), то испытание на утечку проводят ещё на 24 упаковках. Не более 2 упаковок из 36 могут иметь скорость утечки больше 750 мг/год и ни для одной упаковки из 36 скорость утечки не должна превышать 1,1 г/год. При этом в отличие от Фармакопеи США [12] не указано, что эти требования применимы только к аэрозолям для местного применения с клапанами непрерывно действия.

Количественное содержание сальбутамола в аэрозолях нормируют в одной отмеренной дозе в пределах от 80 мкг до 120 мкг [16]. Для аэрозоля сальбутамола с объёмом дозирующей камеры клапана 25 мкл средняя масса дозы составляет 30 мг; при этом в баллон помещают с избытком 250 доз. При исходном содержании сальбутамола 105 мкг/доза и при утечке 525 мг/год к концу срока годности его содержание должно оказаться 122,1 мкг/доза, при утечке 750 мг/год – 131,3 мкг/доза, а при утечке 1100 мкг/доза – 148,3 мкг/доза, что больше верхнего предела содержания сальбутамола. Т.е., фармакопейные нормы утечки содержимого упаковки не могут быть общепринятыми для всех аэрозолей для ингаляции, а должны быть индивидуально обоснованы для каждого препарата.

Риски, связанные с материалами первичной упаковки

При замене производителя клапана требуются исследования экстрагируемых и выделяемых веществ [3, 5], представляющих риск для качества препарата. Кроме того, критическим фактором является номинальный объём дозирующей камеры и допустимые отклонения, так как эти параметры непосредственно связаны с точностью и однородностью дозы, а также расчётом минимального наполнения.

Использование алюминиевых баллонов без покрытия практически не несёт риска для качества, связанного с выделением элементов, которые следует определять в препаратах для ингаляции в соответствии с руководством ICH Q3D [21]. Было проведено количественное определение элементов после хранения аэрозоля сальбутамола [8] в течение 2-х лет в алюминиевых баллонах без внутреннего покрытия. Алюминиевый сплав марки EN AW-5052-0, из которого изготовлены баллоны, кроме Al содержит 0,25% Si, 0,40% Fe, 0,10% Cu, 0,10% Mn, 2,2–2,8% Mg, 0,15–0,35% Cr, 0,10% Zn; любого другого элемента допускается ≤0,05%, а их суммы – ≤0,15%. Из элементов, входящих в алюминиевый сплав марки EN AW-5052-0, в руководстве ICH Q3D относительно препаратов для ингаляции нормируются допустимые суточные экспозиции (PDE) только для Cu (30 мкг/сутки) и Cr (3 мкг/сутки). С учётом максимально допустимых при применении аэрозоля сальбутамола 8 доз в сутки после двух лет его хранения при температуре 25±2 °С суточные экспозиции элементов составили: 0,001 мкг/сутки для Al, 0,00003 мкг/сутки для Cr, 0,0006 мкг/сутки для Fe и 0,009 мкг/сутки для Mg. Другие элементы в препарате не обнаружены.

Большой риск для респираторной фракции сальбутамола представляет замена насадки-ингалятора (актуатора) без соответствующего научного обоснования. На рисунке 14 представлены статические отпечатки факелов распыления для аэрозоля сальбута-

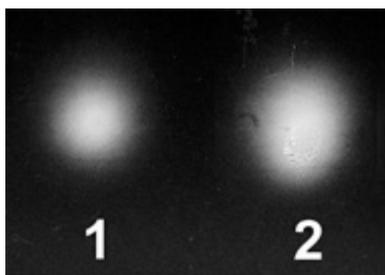


Рисунок 14. Статические отпечатки факелов распыления для аэрозоля сальбутамола, полученные с помощью актуаторов двух производителей

мола [8, 12] при использовании актуаторов с одинаковыми диаметрами выходного отверстия 0,25 мм двух производителей.

Как видно из рисунка 14, при одинаковом диаметре выходного отверстия насадки-ингалятора диаметры факелов распыления существенно отличаются, что обуславливает разное осаждение сальбутамола на ступенях прибора D (рисунок 15).

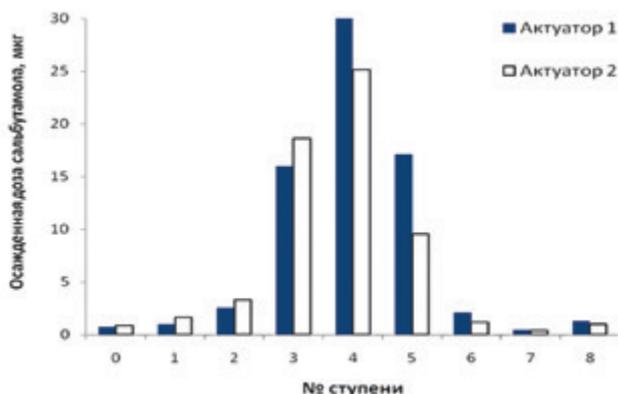


Рисунок 15. Профили осаждения сальбутамола на ступенях прибора D при использовании актуаторов двух производителей

При использовании актуатора 2 на ступенях 3–8 осело 55,99 мкг сальбутамола, что оказалась меньше респираторной фракции в случае актуатора 1 (67,11 мкг) на 16,6%. При этом нереспираторная фракция, осевшая внутри пресепаратора и на ступенях 0–3, при использовании актуатора 2 составила 34,78 мкг и оказалась больше на 42,7%, чем при использовании актуатора 1 (24,37 мкг).

Таким образом, образцы одного и того же препарата с разными актуаторами оказались неэквивалентны друг другу в опытах *in vitro* [18]. Соответственно препарат с актуатором № 2 неэквивалентен *in vitro* референтному препарату Сальбутамол-Тева аэрозоль для ингаляций дозированный 100 мкг/доза [8, 22], а замена актуатора 1 на актуатор 2 несёт риск для эффективности и безопасности разработанного препарата.

Риски, связанные с корректностью процедур контроля качества

Основной риск при контроле качества готовой продукции связан с получением ошибочных результатов при проведении испытаний по показателям «Респираторная фракция» и «Однородность доставляемой дозы». Некорректные результаты этих тестов могут быть обусловлены неправильной сборкой приборов А и/или D, выбором неподходящего переходника для фиксации насадки-ингалятора в приборе, недостаточной герметичностью устройства для сбора дозы вследствие необратимой деформации фторопласта в процессе его продолжительной эксплуатации. Кроме того, при выпуске большого количества доз существует риск закупорки сопла частицами лекарственного вещества и/или оседания на внутренней поверхности насадки-ингалятора значительного количества лекарственного вещества, которое может с очередной дозой попасть внутрь устройства для сбора доз. Для аэрозолей сальбутамола вероятность такого риска можно оценить как малую или среднюю, однако рекомендуется при проведении испытаний после выпуска 100 доз промывать актуатор водой и этанолом, а затем высушивать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы и определены риски для таких функциональных характеристик аэрозолей сальбутамола для ингаляции, как ОДД и респираторная фракция. Эти риски связаны с растворимостью СС в этаноле, составом препарата (наличие этанола и ПАВ), содержанием воды в СС и этаноле, а также распределением частиц СС по размерам. Показана связь между размерами частиц СС, скоростью их седиментации и указанными функциональными характеристиками препарата. Методом РДП исследованы свойства кристаллов СС и показана возможность наличия в них энантиомеров. Обсуждены риски, связанные с производственным процессом, материалами первичной упаковки и корректностью проведения процедур контроля качества. Показано, что использование баллонов из алюминиевого сплава марки EN AW-5052-0 не несёт риска выделения примесей металлов в препарат при хранении. Необоснованная замена насадок-ингаляторов может приводить к существенному изменению функциональных характеристик аэрозолей сальбутамола, что представляет риск для эффективности и безопасности препарата, а также его эквивалентности *in vitro* с референтным препаратом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Компендиум 2016 – лекарственные препараты / Под ред. В. Н. Коваленко. К.: МОРИОН, 2016. 2416 с. [Compendium 2016 – lekarstvennyye preparaty / Pod red. V.N. Kovalenko. [Compendium 2016 - drugs / Ed. V. N. Kovalenko.] K.: MORION, 2016. 2416 s.]

2. EMA/INS/GMP/79818/2011 Pharmaceutical Quality System (ICH Q10), 31 January 2011.
3. EMEA/CHMP/167068/2004 – ICH. – Part I: Note for Guidance on Pharmaceutical Development (ICH Topic Q 8 (R2) Pharmaceutical Development). – Part II: Annex to Note for Guidance on Pharmaceutical Development (ICH Topic Q 8 Annex Pharmaceutical Development), June 2009.
4. EMA/CHMP/CVMP/QWP/BWP/70278/2012-Rev 1 Guideline on process validation for finished products – information and data to be provided in regulatory submissions, 27 February 2014.
5. EMEA/CHMP/QWP/49313/2005 Corr. Guideline on the Pharmaceutical Quality of Inhalation and Nasal Products. London, 21 June 2006.
6. EMA/INS/GMP/79766/2011 Quality Risk Management (ICH Q9), 31 January 2011.
7. EudraLex. – The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. – Volume 4. EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Available at: <http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index.en.htm> (accessed 15.07.2018)
8. Ляпунов Н. А., Безуглая Е. П., Бовтенко В. А., Столпер Ю. М. Сравнительное исследование аэродинамических свойств аэрозолей салбутамола // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018. № 1(22). С. 54–61. [Lyapunov N. A., Bezuglaya E. P., Bovtenko V. A., Stolper Yu. M. Sravnitel'noe issledovanie aerodinamicheskikh svoystv aerozolei sal'butamola // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. [Comparative study of the aerodynamic properties of salbutamol aerosols // Development and registration of drugs.] 2018. № 1(22). P. 54–61.]
9. European Pharmacopoeia. 9th Edition. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France 2016. 4016 p.
10. Ляпунов Н. А., Безуглая Е. П., Бовтенко В. А., Столпер Ю. М. Обоснование нового подхода к оценке качества дозированных аэрозолей для ингаляций на этапе их разработки // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2016. № 5(226). Вып. 33. С. 170–179. [Lyapunov N. A., Bezuglaya E. P., Bovtenko V. A., Stolper Yu. M. Obosnovanie novogo podkhoda k otsenke kachestva dozirovannykh aerozolei dlya ingyalyatsii na etape ikh razrabotki // Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya. [Justification of the new approach to assessing the quality of metered aerosols for inhalation at the stage of their development // Scientific Gazette of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy.] 2016. № 5(226). V. 33. P. 170–179.]
11. Rodriguez-Carvajal J., Roisnel T. Full Prof. 98 and Win PLOTR: New Windows 95/NT Applications for Diffraction. Commission for Powder Diffraction, International Union of Crystallography, Newsletter № 20 (May-August) Summer 1998.
12. USP 36–NF 31. The United States Pharmacopeia and National Formulary 2012 – Copyright © 2012 The United States Pharmacopoeial Convention 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852 – Printed in the United States by United Book Press, Inc., Baltimore, MD. 5642 p.
13. Ляпунов Н. А., Безуглая Е. П., Бовтенко В. А., Столпер Ю. М. Новые технологии производства дозированных аэрозольных препаратов для ингаляций под давлением // Фармаком. 2011. № 1/2. С. 65–74. [Lyapunov N. A., Bezuglaya E. P., Bovtenko V. A., Stolper Yu. M. Novye tekhnologii proizvodstva dozirovannykh aerazol'nykh preparatov dlya ingyalyatsii pod davleniem // Farmakom. [New technologies for the production of metered-dose aerosol preparations for inhalation under pressure // Farmakom.] 2011. № 1/2. P. 65–74.]
14. Бовтенко В. А., Безуглая Е. П., Столпер Ю. М., Ляпунов Н. А. Изучение свойств препаратов салбутамола сульфата в форме дозированных ингаляторов под давлением Фармаком. 2018. № 1. С. 57–70. [Bovtenko V. A., Bezuglaya E. P., Stolper Yu. M., Lyapunov N. A. Izuchenie svoystv preparatov sal'butamola sul'fata v forme dozirovannykh ingyalyatorov pod davleniem Farmakom. [The study of the properties of drugs salbutamol sulfate in the form of metered-dose inhalers under pressure Farmakom.] 2018. № 1. P. 57–70.]
15. Ляпунов Н. А., Безуглая Е. П., Бовтенко В. А., Столпер Ю. М. Аналитическое обеспечение фармацевтической разработки лекарственных средств для ингаляций под давлением. Выбор состава и упаковки // Фармаком. 2008. № 3. С. 65–77. [Lyapunov N. A., Bezuglaya E. P., Bovtenko V. A., Stolper Yu. M. Analiticheskoe obespechenie farmatsevticheskoi razrabotki lekarstvennykh sredstv dlya ingyalyatsii pod davleniem. Vybora sostava i upakovki // Farmakom. [Analytical support of pharmaceutical development of drugs for inhalation under pressure. The choice of composition and packaging // Farmakom.] 2008. № 3. P. 65–77.]
16. Salbutamol Pressurised Inhalation // British Pharmacopoeia. 2013. V. III.
17. Lippmann M. Regional Deposition of Particles in the Human Respiratory Tract. Comprehensive Physiology. 2011. P. 213–232.
18. CPMP/EWP/4151/00 Rev. 1. Guideline on the Requirements for Clinical Documentation for Orally Inhaled Products (OIP) Including the Requirements for Demonstration of Therapeutic Equivalence between two Inhaled Products for Use in the Treatment of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) in Adults and for Use in the Treatment of Asthma in Children and Adolescents. London, 22 January 2009.
19. Groom C. R., Bruno I. J., Lightfoot M. P., Ward S. C. Acta Cryst. 2016. B72. P. 171–179.
20. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2. / МЗ РФ. М., 2015. [Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiiskoi Federatsii. XIII izd. T. 2. / [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII ed. T. 2.] MZ RF. M., 2015.]
21. EMA/CHMP/ICH/353369/2013 ICH guideline Q3D on elemental impurities, 25 July 2016.
22. Регистр лекарственных средств России [Registr lekarstvennykh sredstv Rossii]. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru> (accessed 30.10.2017).

УДК 615.074

ДЕЗИНТЕГРАНТЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РАСТВОРЕНИЕ СУБСТАНЦИЙ РАЗНЫХ КЛАССОВ ПО БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КЛАССИФИКАЦИОННОЙ СИСТЕМЕ

И. Е. Смехова^{1*}, В. А. Вайнштейн¹, Ю. М. Ладутко¹, О. В. Дружининская¹,
Н. Н. Турецкова¹

Резюме. Представлена характеристика дезинтегрантов, применяемых в технологии твердых лекарственных форм, показано их влияние на высвобождение из таблеток субстанций разных классов по биофармацевтической классификационной системе. Представлена характеристика дезинтегрантов, применяемых в технологии твердых лекарственных форм. Приведены механизмы их действия и способы введения в таблетки, а также факторы, которые необходимо учитывать при выборе оптимального разрыхлителя. В статье обсуждаются результаты исследований эффективности разных дезинтегрантов (кросповидона, кроскармеллозы натрия, натрия гликолята крахмала и др.) на высвобождение из таблетированных препаратов субстанций разных классов по биофармацевтической классификационной системе. Отмечается перспективность использования со-разрыхлителей в технологии таблеток субстанций II класса БКС. Приведены примеры дезинтегрантов природного происхождения (слизей), используемых в таблетках, диспергируемых в полости рта.

Ключевые слова: дезинтегранты, таблетки, растворение, субстанции, биофармацевтическая классификационная система.

DISINTEGRANTS AND THEIR INFLUENCE ON THE DISSOLUTION OF SUBSTANCES OF BIOPHARMACEUTICAL CLASSIFICATION SYSTEM CLASSES

I. E. Smekhova^{1*}, V. A. Vainshtein¹, Y. M. Ladutko¹, O. V. Druzhininskaya¹, N. N. Tureckova¹

Abstract. The characteristic of disintegrants used in technology of solid dosage forms is reviewed. The effect on release of substances of different classes from the tablets according to the biopharmaceutical classification system is presented. The characteristic of disintegrants used in technology of solid dosage forms is reviewed. The mechanisms of their action and methods of compounding into tablets, as well as factors that must be considered when choosing the optimal disintegrant, are given. The results of studies on the effectiveness of various disintegrants (crospovidone, croscarmellose sodium, sodium starch glycolate, etc.) on the release of active substances of different classes according to the biopharmaceutical classification system from tablets are discussed. A promising use of co-disintegrating agents in the technology of tablets of substances of class II BCS is highlighted. Examples of disintegrants of natural origin (mucus) used in tablets dispersed in the oral cavity are given.

Keywords: disintegrants, tablets, dissolution, substances, biopharmaceutical classification system.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., Saint-Petersbourg, 197376, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: irina.smekhova@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Одним из популярных путей введения лекарственных препаратов (ЛП) является пероральный из-за системных эффектов, простоты приема, безболезненности, универсальности, а также приверженности пациентов. При некоторых заболеваниях требуется быстрое начало действия препарата, поэтому немедленное высвобождение активной фармацевтической субстанции (АФС) – обязательное условие. По данным литературы с этой проблемой сталкивается около 50% населения, что часто приводит к неэффективной терапии [1, с. 155]. К лекарственным формам (ЛФ) с медленным высвобождением относят те, из которых в течение 30–45 мин растворяется более 85% АФС от количества, указанного на этикетке.

В настоящее время многие АФС, входящие в состав таблетированных препаратов, являются плохо раство-

римыми в воде и демонстрируют неполную абсорбцию, что может привести к снижению их биодоступности. Низкая растворимость в воде АФС II и IV классов по биофармацевтической классификационной системе (БКС) является серьезной проблемой в процессе их доставки [2, с. 3; 3, с. 80]. Для повышения биодоступности таких соединений используются различные технологии, например, получение твердых дисперсий, микронизация, со-осаждение, комплексообразование и другие [4, с. 44; 5, с. 58–59]. Однако значительную роль в улучшении их растворения и биодоступности играют вспомогательные вещества (ВВ).

В соответствии с функциональной классификацией среди ВВ, используемых в технологии таблетированных ЛФ, выделяют разбавители (наполнители), дезинтегранты (разрыхлители), связующие и склеивающие, скользящие вещества, стабилизаторы и др. [6, с.52; 7, с. 15].

Для улучшения абсорбции и биодоступности перорально назначенного препарата АФС должна растворяться или диспергироваться в желудке. Растворение, увеличение удельной свободной поверхности частиц является лимитирующей стадией, от которой зависит скорость и степень абсорбции действующего вещества (ДВ) [8, с. 1].

ВВ по-разному влияют на растворение ДВ и его биодоступность. Для таблеток с немедленным высвобождением начальной стадией, определяющей высвобождение и растворение ДВ, является дезинтеграция (распадаемость) или эрозия таблетки, которая должна в соответствии с требованиями Фармакопеи протекать менее чем за 15 мин для непокрытых обычных таблеток. Для ускорения данного процесса используют дезинтегранты, что позволяет повысить биодоступность нерастворимых и плохо растворимых в воде ДВ [9, с. 35].

Цель настоящей работы – представить характеристику и механизм действия некоторых современных дезинтегрантов, применяемых при производстве таблетированных ЛП, и показать их влияние на высвобождение из таблеток ДВ разных классов по БКС.

ДЕЗИНТЕГРАНТЫ (РАЗРЫХЛИТЕЛИ)

Дезинтегранты – вещества, добавляемые в таблетированные и некоторые капсулированные препараты для улучшения их разрушения в водной среде на более мелкие фрагменты и содействия более быстрому высвобождению АФС [6, с. 52; 10, с. 168]. Скорость разрушения таблетированной формы зависит от многих факторов, в том числе параметров производственного процесса (давления прессования, технологии гранулирования и других), состава ВВ. Однако при прочих равных условиях количество и функциональные характеристики дезинтегрантов могут существенно повлиять на скорость разрушения таблетки и высвобождения АФС, и, в конечном итоге, – на биодоступность последней [10, с. 168; 11, с. 39; 12, с. 1167].

Выделяют дезинтегранты как традиционные, например, на основе крахмала и целлюлозы (крахмал, частично прежелатинизированный крахмал, микрокристаллическая целлюлоза), некоторые природные полисахариды (агар, гуар, трагакант, альгинат), тонкоизмельченные гидрофильные твердые вещества (коллоидный диоксид кремния – аэросил, магнезия алюмосиликат), так и дезинтегранты, полученные химической модификацией крахмала, целлюлозы и повидона, более эффективные и способные к хорошему дезинтеграционному действию при значительно более низких концентрациях. Последние в литературе иногда называют супердезинтегрантами [13, с. 2546]. Их особенностью, обуславливающей дезинтегрирующий эффект, является способность активно поглощать воду и увеличивать объем при увлажнении [9, с. 35].

По происхождению супердезинтегранты классифицируют на синтетические, полусинтетические и природные [14, с. 19].

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ДЕЗИНТЕГРАНТОВ

Существует несколько теорий, предполагающих механизм действия дезинтегрантов, однако обычно реализуется несколько механизмов одновременно [11, с. 40; 12, с. 1168; 13, с. 2547; 15, с. 3; 16]: набухание, капиллярный эффект, действие ферментов, газообразование/химическая реакция, деформация, электростатическое отталкивание, комбинированное действие.

Набухание

Это процесс, при котором разрушающий эффект некоторых дезинтегрантов (например, натрия гликолята крахмала) обусловлен силой, развивающейся вследствие их набухания при контакте с водой (рисунок 1).

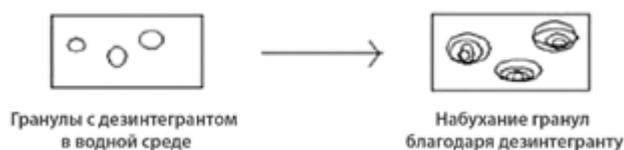


Рисунок 1. Механизм набухания

Способность к набуханию зависит от ряда факторов, в том числе химической структуры, степени поперечного связывания, пористости таблетки, pH среды [13, с. 2546]. Однако не все набухающие вещества улучшают распадаемость, например, способные образовывать гель препятствуют распаду таблетки. Поэтому сильно набухающие агар, карайя, трагакант не являются эффективными дезинтегрантами.

Капиллярный эффект

Дезинтегрирующие не набухающие агенты (например, поперечно-сшитый повидон (кросповидон), кроскармеллоза), действуют по механизму увеличения пористости и капиллярного эффекта. Частицы дезинтегранта, обладающие низкой прессуемостью, увеличивают пористость таблетки. Жидкость проникает в поры за счет капиллярного эффекта и разрушает связи между частицами, вызывая распад таблетки (рисунок 2).

В то же время только формированием пористой капиллярной сети нельзя адекватно объяснить процесс дезинтеграции, необходимо учитывать и другие факторы (например, силу набухания). Так, механизм дезинтегрирующего действия микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) часто используемой в составе таб-



Рисунок 2. Капиллярный эффект

леток и как наполнитель, и как разрыхлитель, связывают и с капиллярным эффектом и с разрушением связей между частицами [13, с. 2548].

Действие ферментов

Некоторые ферменты, присутствующие в организме человека, действуют как дезинтегранты, уменьшая связывающую эффективность связующих. При набухании давление изнутри приводит к разрыву таблетки и/или ускоренное поглощение воды – к увеличению гранул в объеме, что также способствует разрушению таблетки [17, с. 2771].

Газообразование /химическая реакция

При смачивании таблеток основные (натрия и калия карбонаты, натрия гидрокарбонат) и кислотные (органические кислоты: лимонная, винная, аскорбиновая, яблочная и др.) компоненты взаимодействуют между собой с образованием углекислого газа. Возникающее в таблетке давление приводит к ее дезинтеграции. Неорганические карбонаты также могут рассматриваться как вторичные разрыхлители, так как они способны облегчить дезинтеграцию таблетки путем взаимодействия с кислым желудочным соком и выделением углекислого газа [13, с. 2546].

Деформация

Зерна крахмала обычно «эластичны» по природе и изменяют свою форму при действии на них давления, после прекращения давления форма восстанавливается. Однако при применении к этим зернам давления при прессовании таблеток они подвергаются пластической деформации и запасают энергию деформации. При попадании в водную среду деформиро-

ванные зерна восстанавливают исходную структуру и увеличиваются в объеме, что приводит к распаду таблетки.

Предполагается, что это не единственный механизм, объясняющий действие большинства дезинтегрантов, но, вероятно, один из основных [15, с. 5].

Электростатическое отталкивание

Ненабухающие частицы также могут вызывать дезинтеграцию таблеток. Процесс основан на электростатических силах отталкивания, возникающих в присутствии воды (рисунок 3). Установлено, что отталкивание является вторичным по отношению к смачиванию [15, с. 6].

Комбинированное действие

Дезинтегрирующее действие обусловлено несколькими механизмами, например, за счет увлажнения и набухания.

Обобщенные механизмы действия дезинтегрантов схематически представлены на рисунке 4 [13, с. 2553]. Они не являются независимыми и иногда дополняют друг друга. Попадание воды в ядро лекарственной формы (ЛФ) является первым этапом процесса дезинтеграции и, следовательно, капиллярное действие первично влияет на все другие механизмы разрыхления. Быстрое капиллярное действие позволяет воде легко достигать разрыхлителей. Последние, работающие по механизму набухания или деформации, будут почти мгновенно обеспечивать высокую скорость распадаемости после срабатывания капиллярного действия. Поступление воды будет также влиять и на процесс генерации газа в шипучих таблетках [13, с. 2552].

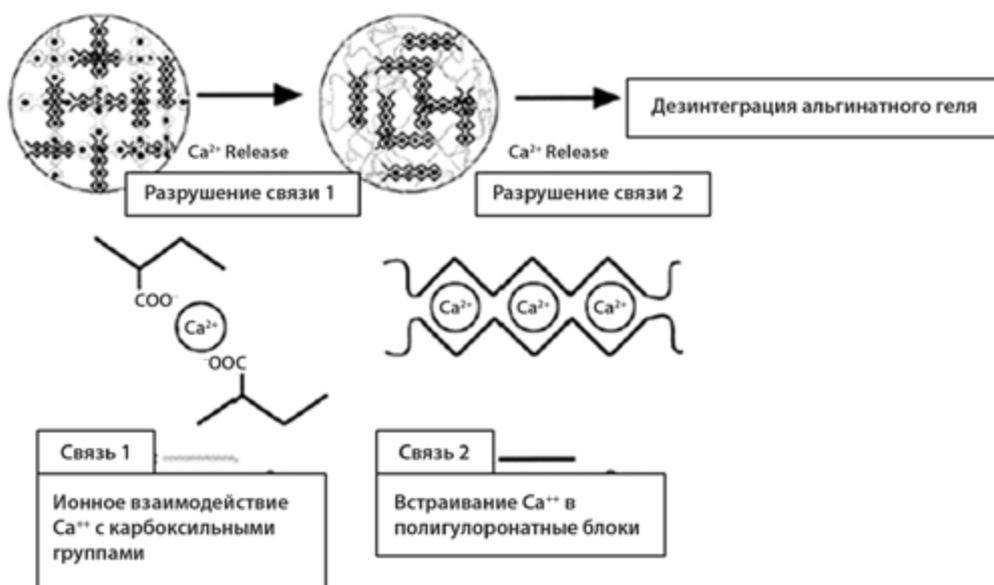


Рисунок 3. Электростатическое отталкивание



Рисунок 4. Схема механизмов дезинтегрирующего действия [13, с. 2553]

При создании таблеток с немедленным высвобождением особое значение имеет выбор дезинтегранта. Особенно это важно для АФС II и IV классов по БКС.

ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗРЫХЛИТЕЛЕЙ

Ряд поперечно связанных полимеров, используемых в твердых дозированных ЛФ, таких как кросповидон, натрия кроскармеллоза и натрия гликолят крахмала, называют супредеинтегрантами [9, с. 35]. Они обеспечивают быструю дезинтеграцию при небольшом количестве, как при влажном, так и при сухом гранулировании, а также прямом прессовании таблеток; однако эти разрыхлители отличаются с химической точки зрения и морфологией частиц.

Крахмал и его производные

Крахмал и его производные являются универсальными ВВ, которые в таблетированных препаратах используют с различной целью: и в качестве разрыхли-

телей, и связующих, и наполнителей, и др. Однако он не обладает идеальными свойствами для некоторых из перечисленных функций. Он не обладает хорошей прессируемостью. В качестве эффективного разрыхлителя его требуется большое количество (10–15%), что снижает прочность таблеток.

Нагревание зерен крахмала разрушает их структуру путем желатинизации, что приводит к получению так называемых желатинизированных крахмалов. Прежелатинизация существенно влияет на физические свойства предварительно обработанного крахмала и его возможное применение как ВВ. Он может играть роль связующего, наполнителя и дезинтегранта (крахмал 1500). В качестве последнего его используют в концентрации 5–10%. Основным механизмом действия считается набухание [16].

Модифицированный крахмал – натрия карбоксиметилкрахмал (химически обработанный картофельный крахмал) (другие его названия: натрия гликолят крахмала, натриевая соль гликолята крахмала (Explotab, Primogel)) представляет собой натриевую соль шитого карбоксиметилированного крахмала.

Механизм его действия заключается в быстром и обширном набухании с минимальным гелеобразованием. По сравнению с высушенным крахмалом, который набухает в воде до 10–20%, модифицированный увеличивается в объеме до 200–300% [17, с. 2776].

Эффективная концентрация при таблетировании составляет 4–6%, но может колебаться в пределах от 2% до 8% [13, с. 2549; 16]. При концентрации выше 8% время дезинтеграции увеличивается за счет гелеобразования и последующего повышения вязкости.

Натрия карбоксиметилкрахмал имеет хорошую способность к набуханию, что в сочетании со скоростью проникновения воды является причиной быстрого высвобождения АФС из таблетки. Он также способен противодействовать отрицательному влиянию гидрофобных смазывающих веществ (например, магния стеарата) на дезинтеграцию таблеток [18, с. 40].

Целлюлоза и ее производные

Модификации и производные целлюлозы занимают важное место в технологии твердых дозированных ЛФ. Они используются на разных стадиях технологического процесса и, в зависимости от особенностей структуры и способа применения, могут играть различную роль.

Природная целлюлоза состоит из чередующихся микрокристаллических звеньев и менее плотных аморфных частей. Кислотный гидролиз целлюлозы разрушает полимерные цепи, разрывая аморфные части, но оставляет микрокристаллические фрагменты относительно нетронутыми, что дает широкие возможности для использования МКЦ в качестве ВВ.

МКЦ в производстве таблеток используется с 1962 года. Ее получают путем частичного гидролиза хлопковой целлюлозы кислотой хлористоводородной. Она совместима с различными АФС, особенно влагочувствительными.

В таблетках МКЦ может играть роль разрыхлителя, разбавителя, связующего, способна подвергаться пластической деформации при относительно низком давлении. Эффективность дезинтегрирующего действия МКЦ невелика, ее может потребоваться до 20%.

Как дезинтегрант МКЦ эффективна в смеси с крахмалом и продуктами его модификации. Она относительно химически инертна, но при определенных условиях может взаимодействовать с компонентами ЛФ. Например, при ее растирании с ацетилсалициловой кислотой (АСК, I класс БКС) в вибромельнице образуются «привитые комплексы». МКЦ легко поглощает воду и подвергается гидратации, что оказывает благоприятное воздействие на процесс высвобождения АФС из таблеток [19, с. 25]. Разные марки МКЦ по-разному влияют на распадаемость и однородность дозирования АФС в таблетках (например, Avicel PH-200 лучше, чем Vivapur 190G) [20, с. 73].

Водонерастворимые производные целлюлозы, в том числе МКЦ, кросс-карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) могут адсорбировать АФС при влажной грануляции или в процессе испытания «Растворение», тем самым обуславливая неполное ее высвобождение [21, с. 3].

Низкозамещенная гидроксипропилцеллюлоза представляет собой модифицированную гидрофильную растворимую в воде целлюлозу и может быть использована как разрыхлитель таблеток в диапазоне концентраций 2–10%.

Еще одной модификацией целлюлозы является кросскармеллоза натрия – поперечно связанная форма натрий карбоксиметилцеллюлозы (другое название: натриевая соль кросскармеллозы, например, Ac-Di-Sol (Accelerates Dissolution, ускоряет растворение), Nymcel).

Механизм действия: капиллярный эффект (активное продвижение воды по ее гидрофильным волокнам), набухание с минимальным гелеобразованием. Механизмы набухания, увлажнения и деформации позволяют характеризовать ее как супердезинтегрант [13, с. 2550].

Эффективные концентрации составляют 1–3% при прямом прессовании и 2–4% при влажном гранулировании [16; 22, с. 107].

Натрия гликолят крахмала обладает выраженным эффектом набухания (рисунок 5б). По механизму дезинтеграции, скорости и степени набухания он существенно отличается от других применяемых дезинтегрантов, например, кросскармеллозы натрия, проявляющей капиллярный эффект (рисунок 5а). Преимущества натрия гликолята крахмала по скорости поглощения и объему поглощенной жидкости сохраняются независимо от pH среды. Так, при добавлении жидкостей, близких по pH к содержимому кишечника (pH 6,8), натрия гликолят крахмала в первые минуты набухает примерно в 3 раза быстрее, чем кросскармел-

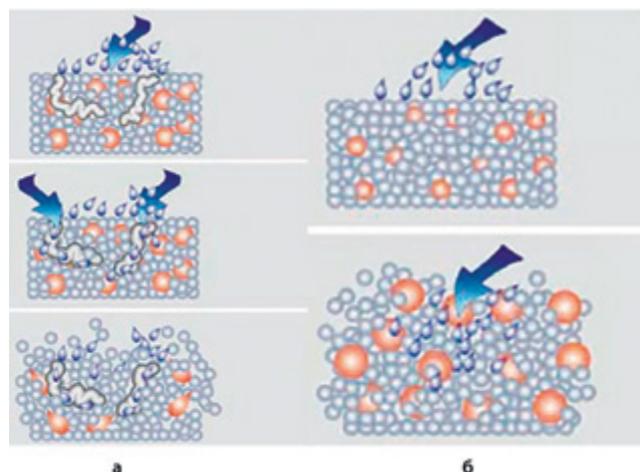


Рисунок 5. Отличия механизма действия супердезинтегрантов [23, с. 33]

а) кросскармеллоза натрия; б) натрия гликолят крахмала

лоза натрия, и достигает максимального объема в 3–4 раза большего (до 15 мл/г), чем кроскармеллоза (до 3,5 мл/г) и другие дезинтегранты [23, с. 33].

Кросповидон

Кросповидон (crospovidone) – поперечно сшитый поливинилпирролидон – нерастворим в воде и сильно гидрофилен; его марки: кросс-повидон, полиплаздон XL (Polyplasdone XL). Обладает химическими свойствами поливинилпирролидона и высокопористой морфологией частиц, что обуславливает большую площадь поверхности и приводит к повышению растворения плохо растворимых АФС.

Механизм действия заключается в поглощении воды (выраженное капиллярное действие), слабом набухании, возможно, некоторое восстановление деформации. Однако единого мнения по поводу механизма действия дезинтегранта нет [13, с. 2550].

Эффективная концентрация составляет 2–4% в таблетках, получаемых как прямым прессованием, так и влажной грануляцией.

Смолы и их производные

Ионообменные смолы также используются в качестве дезинтегрантов в таблетках. Наиболее часто применяется калия полакрилин. Его получают сополимеризацией метакриловой кислоты и дивинилбензола с последующей нейтрализацией продукта калия гидроксидом [13, с. 2550]. Калия полакрилин гидрофилен, обладает хорошими набухающими свойствами. Используется в таблетках в концентрации 2–10%, хотя обычно достаточно 2–3%.

Калия полакрилин (Kupon T-314) – полимер высокой чистоты, используется в таблетках, капсулах, пеллетах и др. как супер быстрый дезинтегрант, улучшающий распадаемость и растворение твердых ЛФ. Представляет собой белый хорошо сыпучий порошок, пригодный как для получения таблеток методом влажного гранулирования, так и прямым прессованием. Как разрыхлитель очень быстро набухает при контакте с водой или жидкостями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), вызывая дезинтеграцию таблетки без образования комков. Эффективная концентрация составляет от 0,5 до 4,0%. Механизм действия, улучшающий растворение, заключается в разрушении таблетки на мелкие частицы, что приводит к увеличению эффективной площади поверхности для абсорбции АФС, и, таким образом, повышает ее растворение и биодоступность [24]. Свойства некоторых дезинтегрантов приведены в таблице 1 [22, с. 108].

В медицинской практике наиболее широко используются таблетки, предназначенные для проглатывания целиком, они дезинтегрируются и быстро высвобождают АФС в ЖКТ. Решающее значение при разработке состава таких таблеток имеют правильный выбор дезинтегранта и его эффективность [25, с. 4].

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО ДЕЗИНТЕГРАНТА. ТРЕБОВАНИЯ К НИМ

В связи с тем, что дезинтегранты используются в качестве ВВ в составе таблетки, они должны отвечать определенным критериям, отличным от способности к набуханию.

При выборе дезинтегранта необходимо рассмотреть его влияние на эффективность готовой ЛФ, которое в каждом конкретном случае может быть неодинаковым и зависеть от ее типа, степени растворимости АФС, состава рецептуры и т.п. [9, с. 35]. При этом необходимо учитывать следующие факторы [11, с. 41; 15, с. 2]: количество дезинтегрантов, присутствующих в составе препарата; прочность таблетки; плохие растворимость и способность к гелеобразованию; способ введения и смешивания; природу АФС; сыпучесть и прессируемость; наличие поверхностно-активных веществ; органолептические (вкусовые) свойства и др.

Плохие растворимость и способность к гелеобразованию

Растворимость в технологии таблеток может влиять как на скорость, так и на механизм дезинтеграции ЛФ. Водорастворимые продукты с большей вероятностью растворятся, чем распадутся, в то время как нерастворимые компоненты обычно приводят к быстрой распадаемости таблеток. Гели могут замедлять растворение, т.к. перед высвобождением и абсорбцией в организме АФС сначала должна диффундировать через слой геля [26, с. 149].

По способности к набуханию дезинтегранты располагают следующим образом: приможель (Primojel) > кроскармеллоза натрия (Ac-Di-Sol) >> полиплаздон (Polyplasdone XL10) [27, с. 121].

Природа АФС

Кроскармеллоза натрия – соль натрия, образованная поперечными связями, частично O-(карбоксиметилированной) целлюлозы, а натрия гликолла крахмала–натриевая соль карбоксиметилового эфира крахмала. Оба дезинтегранта представляют собой соли натрия и являются анионными. Кроме того, их полимерные основы состоят в основном из повторяющихся мономеров глюкозы. В отличие от них, кросповидон – неионный нерастворимый гомополимер N-винил-2-пирролидона, сшитый поперечными связями. С химической точки зрения структура кросповидона идентична структуре поливинилпирролидона, широко используемого в качестве ингредиента твердых ЛФ [28, с. 97]. В связи с тем, что анионные дезинтегранты могут взаимодействовать с катионными АФС и замедлять их растворение, для последних предпочтительнее использовать неионные. Например, показано более сильное влияние полиплаздона XL по срав-

Таблица 1.

Дезинтегранты и их свойства

Дезинтегрант	Коммерчески доступные марки	Механизм действия	Концентрация, %	Примечание	Критерии стабильности
Поперечно сшитая целлюлоза	Кроскармеллоза, Ac-Di-Sol [†] , Nymse ZSX [†] , Primellose [†] , Solutab [®] , Vivasol [†] и др.	Набухает в 4-8 раз за <10сек. Удельная площадь поверхности 0,81-0,83 м ² /г. Показатель набухания - 65 ± 1,7об.%	5-15	Прямое прессование или гранулирование без крахмала	Стабильна при хранении в герметичном контейнере (в сухом защищенном от света месте)
Поперечно сшитый ПВП	Crossrovidon M [®] Kollidon [®] Polyplasdone [®]	Набухает незначительно. Высокая скорость набухания по сравнению с другими разрыхлителями. Больше отношение площади поверхности к объему, чем у других разрыхлителей. Показатель набухания - 58 ± 1,5 об.%. Механизм действия - капиллярный	2-5	Практически нерастворим в воде, губчатый в природном состоянии. Выпускается в микронизированном (XL) виде при необходимости улучшения дисперсности порошковой смеси.	Из-за гигроскопичности должен храниться в герметичном контейнере в прохладном и сухом месте
Поперечно сшитый крахмал	Explotab [®] Primogel [®]	Набухает в 7-12 раз за <30сек В высокой концентрации подвергается гелеобразованию, что снижает распадаемость. Показатель набухания - 52±1,2 об. %.	5-10	Набухает в трех направлениях, служит матрицей для модифицированного высвобождения. При превышении 8% время распадаемости может увеличиваться из-за гелеобразования и последующего увеличения вязкости	Стабилен при хранении в сухом месте в герметичном контейнере
Поперечно сшитая альгиновая кислота	Альгиновая кислота NF	Быстро набухает в водной среде, действует по капиллярному механизму.	1-5	Улучшает дезинтеграцию как при сухом, так и при влажном гранулировании	Гидролизует медленно при комнатной температуре
Сополисахариды	Emcosoy [®]			Не содержит крахмал или сахар. Используется в пищевых продуктах	
Кальция силикат		Капиллярное действие		Высокопористый, легкий	

нению с кроскармеллозой натрия и примогелем на скорость растворения катионных АФС из модельных препаратов независимо от их растворимости в воде [29, с. 944; 30, с. 185].

Гидрофобные АФС и ВВ могут адсорбироваться на поверхности дезинтегрантов и оказывать влияние на их эффективность и степень гидратации. Решить эту проблему можно добавлением дезинтегрантов с высокой гидратационной способностью.

Хорошая прессуемость и сыпучесть

Кросповидоны считаются значительно более прессуемыми по сравнению с другими дезинтегрантами [26, с. 150].

Прочность таблетки

Установлено влияние дезинтегрантов на физические характеристики таблеток, такие как прочность на излом и твердость [31, с. 4].

СПОСОБЫ ДОБАВЛЕНИЯ ДЕЗИНТЕГРАНТОВ В ТАБЛЕТКИ

Существует три способа введения дезинтегрирующих агентов в таблетки.

1) Введение в состав гранул

При использовании метода влажного гранулирования дезинтегрант добавляют к другим ВВ перед увлажнением сухой массы гранулирующей жидкостью. Так дезинтегрант включается внутрь гранул.

Было показано, что включение натрия кроскармеллозы внутрь гранул обеспечивало более быстрое растворение таблеток по сравнению с таблетками, в которые дезинтегрант был введен другими способами. На прочность таблеток способ введения не влиял [15, с. 3].

2) Опудривание гранулята перед прессованием

Как при влажном, так и сухом гранулировании разрыхлитель добавляется к гранулам перед прессованием путем сухого смешения.

При изучении влияния способа включения дезинтегранта (натрия кроскармеллозы, натрия гликолята крахмала и кросповидона) на растворение АФС с различной растворимостью в воде (карбамазепин (II класс БКС), парацетамол (IV класс БКС), цетризина гидрохлорид (I класс БКС)) из модельных таблеток, полученных методом влажной грануляции, показана эффективность кросповидона при добавлении в режиме опудривания [15, с. 3].

3) Комбинированное введение

При этом способе разрыхлитель делится на две части. Одну вводят в состав гранулята при получении гранул, оставшуюся – путем опудривания гранулята

сухим смешением. Предпочтительность способа введения дезинтегранта зависит главным образом от вида АФС и технологического оборудования, и отрабатывается экспериментально [16].

ПРЕИМУЩЕСТВА СУПЕРДЕЗИНТЕГРАНТОВ

Дезинтегранты широко применяются не только в технологии таблеток немедленного высвобождения, но и в других: диспергируемых в полости рта (ОДТ); с ускоренным высвобождением; в капсулах, растворяющихся в ротовой полости и др. ЛФ [11, с. 42; 17, с. 2768; 30, с. 186], что связано с рядом их преимуществ [16]:

- при дезинтеграции таблеток не образуются комки;
- совместимы с обычно используемыми АФС и ВВ;
- одинаково эффективны в гидрофильных и гидрофобных композициях;
- обеспечивают хорошую механическую прочность таблеток, облегчая упаковку и транспортирование;
- действуют в низких концентрациях.

В то же время отмечают некоторые ограничения применения супердезинтегрантов в фармацевтических целях [16; 17, с. 2773]:

- большая гигроскопичность (что может быть проблемой для препаратов чувствительных к влаге АФС);
- некоторые из них (анионные) могут *in vitro* связываться с катионными АФС (без возникновения проблем *in vivo*);
- набухание кроскармеллозы и натрия гликолята крахмала (в отличие от кросповидона) зависит от pH и ионной силы среды. Кислая среда значительно уменьшает скорость проникновения жидкости и эффективность этих дезинтегрантов [27, с. 126; 28, с. 99].

СРАВНЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ДЕЗИНТЕГРАНТОВ

Применение супердезинтегрантов позволяет решить одну из наиболее сложных проблем – повышение биодоступности нерастворимых и плохо растворимых в воде АФС, биодоступность которых находится в прямой зависимости от скорости дезинтеграции ЛФ [9, с. 35].

Кросповидон, кроскармеллоза натрия и натрия гликолят крахмала применяются для осуществления одной и той же функции в рамках рецептуры, однако они отличаются по своей химической структуре, морфологии частиц и свойствам порошка. Кросповидон встречается в виде частиц различного размера: Тип В отличается меньшим средним размером частиц по сравнению с Типом А [28, с. 95]. Проведенное всестороннее исследование для оценки воздействия кро-

сповидона, кроскармеллозы натрия и натрия гликолята крахмала на скорость растворения АФС разных классов по БКС из таблеток показало, что наибольшую скорость растворения АФС обеспечивал кросповидон Типа В, причем прочность таблеток и дезинтеграция не оказывали влияния на растворение [28, с. 99].

В другом исследовании изучена эффективность кросповидона, кроскармеллозы натрия, а также натрия гликолята крахмала при растворении восьми катионных субстанций из таблеток, полученных методом прямого прессования, содержание дезинтегранта в которых составляло 2% от массы. Значительной разницы во времени растворения таблеток не наблюдалось. Однако показано большее, по сравнению с другими дезинтегрантами, влияние кросповидона на высвобождение исследуемых катионных АФС независимо от их растворимости в воде. Причиной замедления растворения при действии других дезинтегрантов авторы считают возможное взаимодействие их с АФС катионной природы [28, с. 94].

Аналогичные результаты получены и при сравнении влияния трех дезинтегрантов на высвобождение эфавиренза (Efavirenz, IV класс по БКС) из таблеток. Причем способ введения кросповидона не оказывал влияния на скорость растворения субстанции [30, с. 185].

Большее влияние кросповидона Тип В (Polyplasdope XL-10) установлено и при изучении высвобождения из таблеток АФС разных классов (I класса – тербинафин г/хл, лоратадин; II класса – аторвастатин, невирапин, клопидогрела бисульфит, эзетимиб, карбамазепин, симвастин, ралоксифен г/хл; III класса – ацикловир; IV класса – ефавиренз) по сравнению с другими дезинтегрантами (кросповидон Тип А (Polyplasdope XL), кроскармеллоза натрия, натрия гликолят крахмала (Glycolys)), как в рекомендованной, так и в дискриминирующей среде растворения. Причем отмечается, что кросповидон Тип В – единственный дезинтегрант, присутствие которого приводило к высвобождению более 80% АФС в дискриминирующей среде растворения [31, с. 6].

В то же время при изучении влияния дезинтегрантов на растворение дапаглифлозина (dapagliflozin, III класс БКС [32, с. 15]) из таблеток с немедленным высвобождением, полученных методом прямого прессования, для дальнейших исследований был выбран Kryoon T-314, содержание которого 6% приводило к высвобождению 99,93% вещества [33, с. 61].

Среди трех изученных дезинтегрантов (кросповидон, кроскармеллоза натрия, натрия гликолят крахмала) наибольшее влияние на растворение атенолола (III класс БКС) из таблеток оказывал натрия гликолят крахмала в количестве 6% [34, с. 52].

Эффективность дезинтегрантов показана и при исследовании скорости растворения катионных АФС с различной растворимостью в воде (класс I: цетири-

зина гидрохлорид, фексофенадина гидрохлорид, тербинафин, венлафаксина гидрохлорид; класс II: хлорпромазина гидрохлорид, клопидогрела бисульфит, хлорпромазина гидрохлорид; класс III: ципрофлоксацина гидрохлорид, ранитидина гидрохлорид). Как правило, в присутствии кросповидона (полипласдон XL) катионные АФС проявляли большую скорость растворения независимо от их растворимости в воде, что обусловлено отсутствием ионного взаимодействия, в отличие от других дезинтегрантов [35, с. 18].

Малоизученным, однако, перспективным считается использование со-разрыхлителей (путем объединения или разных разрыхлителей или их с другими добавками) [13, с. 2553]. На примере таблеток ибупрофена (II класс по БКС) показана перспективность использования двух супердезинтегрантов в одной ЛФ для улучшения растворения субстанции из таблеток. В качестве таковых были выбраны кросповидон и кроскармеллоза натрия, как обладающие разным механизмом действия и функционально дополняющие друг друга [36, с. 5].

Сочетание двух супердезинтегрантов (кроскармеллозы натрия и натрия гликолята крахмала в соотношении 1:2) также рекомендовано и для диспергируемых во рту таблеток ламотриджина (II класс БКС), полученных методом прямого прессования [37, с. 76].

Использованием в качестве ВВ комплекса дезинтегранта крахмала и супердезинтегранта натрия гликолята крахмала объясняется и быстрое начало действия таблеток нимесулида (II класс БКС). Первый обеспечивает хороший капиллярный эффект, а второй дополняет его высокой степенью набухания и стремительным увеличением объема. Быстро сорбируя большой объем жидкости, супердезинтегрант как бы «взрывает» таблетку изнутри, способствуя ее трехмерному расширению, достижению так называемого 3D-эффекта [23, с. 33].

Несмотря на использование в технологии большого ассортимента дезинтегрантов, продолжается поиск новых разрыхлителей, в том числе среди природных продуктов [38, с. 777]. В таблице 2 приведены некоторые примеры слизей, используемых в качестве дезинтегрантов в таблетках, диспергируемых в полости рта [17, с. 2775].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ВВ не являются пассивной составляющей ЛФ. Препараты, содержащие одну и ту же АФС, но разный состав ВВ, могут различаться по фармацевтическим показателям, биодоступности, эффективности, пролонгации действия и другим характеристикам. Поэтому выбор ВВ, в частности, дезинтегрантов, должен осуществляться с обязательным изучением их влияния на распадаемость, прочность, высвобождение, стабильность и другие технологические и фармацевтические показатели.

Таблица 2.

Примеры применения слизей как супердезинтегрантов [по [17, с. 2775] с изм.]

Слизь	АФС, класс БКС	Метод получения таблеток	Результат
Lepidium Sativum (кресс салат)	Нимесулид, II	Прямое прессование	Время распадаемости 17 с, среднее время растворения 5,27 с при концентрации 10% по массе. Лучше, чем синтетические дезинтегранты (Ac-di-sol и натрия гликолята крахмала)
Plantago ovate mucilage (слизь подорожника яйцевидного)	Прохлорперазина maleат	Прямое прессование	Время распадаемости 8 сек при концентрации 8% по массе
Hibiscus rosa sinensis Linn. Mucilage powder (порошок слизи гибискуса, китайской розы)	Ацеклофенак, II	Прямое прессование	При концентрации 6% по массе время дезинтеграции 20 с
Fenugreek seed mucilage (слизь семян пажитника сенного)	Метформина гидрохлорид, III	Прямое прессование	Время дезинтеграции 15,6 с, 100% высвобождение АФС за 18 мин при концентрации 4% по массе. С кроскармеллозой натрия время распадаемости 28 сек при оптимальной концентрации (8%)
Cucurbita maxima pulp powder (порошок мякоти гигантской тыквы)	Диклофенак натрия, II	Влажное гранулирование	Время дезинтеграции 7,23 мин при концентрации 2,5% по массе
Ocimum gratissimum mucilage powder and seed powder (слизь порошка и семян базилика эвгенольного)	Метформина гидрохлорид, III	Прямое прессование	Порошок слизи и порошок семян оба в концентрации 5% по массе, время распадаемости 43 и 45 с, соответственно
Chitosan (хитозан)	Циннаризин, II	Влажное гранулирование	Приятное ощущение во рту, время дезинтеграции 60 сек при концентрации 3% по массе

Перспективными являются поиск новых и/или альтернативных дезинтегрантов, а также оптимизация комбинаций существующих разрыхлителей для обеспечения их синергического действия и маскировки их нежелательных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sandeep N., Gupta M.M. Immediate Drug Release Dosage Form: A Review // Journal of Drug Delivery & Therapeutics. 2013. V. 3(2). P. 155–161.
2. Раменская Г. В., Савченко А. Ю., Шохин И. Е., Котлова М. А., Кулинич Ю. И., Василенко Г. Ф., Кукес В. Г. Биофармацевтическая классификация жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств // Фармация. 2011. № 5. С. 3–11. [Ramenskaya G. V., Savchenko A. Yu., Shokhin I. E., Kotlova M. A., Kulnich Yu. I., Vasilenko G. F., Kukes V. G. Biofarmatsevticheskaya klassifikatsiya zhiznenno neobkhodimykh i vazhneishikh lekarstvennykh sredstv // Farmatsiya. [Biopharmaceutical classification of essential medicines // Pharmacy.] 2011. № 5. P. 3–11].
3. Свистунов А. А., Раменская Г. В., Шохин И. Е. Испытание «Растворение» в фармацевтической практике. Современные подходы, концепции и биофармацевтические аспекты // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. 2011. № 11. С. 79–80. [Svistunov A. A., Ramenskaya G. V., Shokhin I. E. Ispytanie «Rastvorenie» v farmatsevticheskoi praktike. Sovremennyye podkhody, kontseptsii i biofarmatsevticheskie aspekty // Remedium. Zhurnal o rossiiskom rynke lekarstv i meditsinskoj tekhnike. [Dissolution test in pharmaceutical practice. Modern approaches, concepts and biopharmaceutical aspects // Remedium.] 2011. № 11. P. 79–80.]
4. Алексеев К. В., Тихонова Н. В., Бlynская Е. В., Карбушева Е. Ю., Турчинская К. Г., Михеева А. С., Алексеев В. К., Уваров Н. А. Технология повышения биологической и фармацевтической доступности лекарственных веществ // Вестник новых медицинских технологий. 2012. Т. XIX. № 4. С. 43–47. [Alekseev K. V., Tihonova N. V., Blynskaya E. V., Karbusheva E. Ju., Turchinskaja K. G., Miheeva A. S., Alekseev V. K., Uvarov N. A. Tehnologija povyshenija biologicheskoi i farmatsevticheskoi dostupnosti lekarstvennykh veshhestv // Vestnik novykh medicinskih tehnologij. [Technology of increasing the biological and pharmaceutical accessibility of medicinal substances // J. New Medical Technologies.] 2012. T. XIX. № 4. P. 43–47.]
5. Демина Н. Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 2(19). С. 56–60. [Demina N. B. Biofarmatsevticheskaja klassifikacionnaja sistema kak instrument razrabotki dizajna i tehnologii lekarstvennoj formy // Razrabotka i registracija lekarstvennykh sredstv. [Biopharmaceutical classification system as a tool for the development of drug formulations and their designs // Drug Development & Registration.] 2017. № 2(19). P. 56–60.]
6. Алеева Г. Н., Журавлева М. В., Хафизьянова Р. Х. Роль вспомогательных веществ в обеспечении фармацевтических и терапевтических свойств лекарственных препаратов (Обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2009. Т. 43. № 4. С. 51–56. [Aleeva G. N., Zhuravleva M. V., Hafiz'janova R. H. Rol' vspomogatel'nyh veshhestv v obespechenii farmatsevticheskikh i terapevticheskikh svojstv lekarstvennykh preparatov (Obzor) // Himiko-farmatsevticheskij zhurnal. [The role of auxiliary components in ensuring pharmaceutical and therapeutic properties of drugs (a review) // Pharmaceutical Chemistry Journal.] 2009. T. 43. № 4. P. 51–56.]
7. Walsh J., Cram A., Woertz K., Breitreutz J., Winzenburg G., Turner R., Tuleu C. Playing hide and seek with poorly tasting paediatric medicines: Do not forget the excipients // Advanced Drug Delivery Reviews. 2014. V. 73. P. 14–33.
8. Vadlamudi M. K., Dhanaraj S. Significance of excipients to enhance the bioavailability of poorly water-soluble drugs in oral solid dosage forms: A Review // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2017. V. 263. 022023. P. 1–16.
9. Воскобойникова И. В., Авакян С. Б., Сокольская Т. А., Тюляев И. И., Багирова В. Л., Колхир В. К., Сакович Г. С. Применение супердезинтегрантов в твердых дозированных лекарственных формах // Фармация. 2005. № 2. С. 35–37. [Voskoboynikova I. V., Avakjan S. B., Sokol'skaja T. A., Tjuljaev I. I., Bagirova V. L., Kolhir V. K., Sakovich G. S. Primenenie superdezintegranтов v tverdyh dozirovannykh lekarstvennykh formah // Farmacija. [Use of superdisintegrants in solid dosage forms // Pharmacy.] 2005. № 2. P. 35–37.]

10. *Сеткина С. Б., Хишова О. М.* Биофармацевтические аспекты технологии лекарственных средств и пути модификации биодоступности // Вестник ВГМУ. 2014. Т. 13. № 4. С. 162–172. [Setkina S. B., Hishova O. M. Biofarmaceuticheskie aspekty tehnologii lekarstvennyh sredstv i puti modifikacii biodostupnosti // Vestnik VGMU. 2014. T. 13. № 4. P. 162–172.]
11. *Kaur V., Mehara N.* A Review on: Importance of Superdisintegrants on Immediate Release Tablets // International Journal of Research and Scientific Innovation. 2016. V. III(II). P. 39–43.
12. *Qureshi M. S., Zafar F., Ali H., Hameed K., Mallick N., Khan S., Baloch S. A.* Superdisintegrant on disintegrant and dissolution; A review on influence // Professional Med J. 2016. V. 23(10). P. 1167–1170.
13. *Desai P. M., Liew C. V., Heng P. W. S.* Review of Disintegrants and the Disintegration Phenomena // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016. V. 105(9). P. 2545–2555.
14. *Deshmukh H., Chandrashekar S., Nagesh C., Anmol M., Shridhar U.* Superdisintegrants: A Recent Investigation and Current Approach // Asian Journal of Pharma and Technology. 2012. V. 2(1). P. 19–25.
15. *Nasir A., Gohar U. F., Ahmad B.* A Review Article On: Superdisintegrants // International Research Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017. V. 8. P. 1–11.
16. *Carter J. C.* The role of disintegrants in solid oral dosage manufacturing. 2009. Carter Pharmaceutical Consulting Inc. Available at: <http://www.carterpharmaceuticalconsulting.com/articles/The-role-of-disintergrants.html> (accessed 11.06.2018).
17. *Pahwa R., Gupta N.* Superdisintegrants in the development of orally disintegrating tablets: a review // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2011. V. 2(11). P. 2767–2780.
18. *Андреев П. В.* Применение отечественных модифицированных крахмалов в химико-фармацевтической промышленности // Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т. 38. № 8. С. 37–41. [Andreev P. V. Primenenie otechestvennyh modifitsirovannyh krahmalov v himiko-farmaceuticheskoj promyshlennosti // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2004. T. 38. № 8. S. 37–41.]
19. *Воскобойникова И. В., Авакян С. Б., Сокольская Т. А., Тюляев И. И., Багирова В. Л., Колхир В. К., Сакович Г. С.* Современные вспомогательные вещества в производстве таблеток. Использование высокомолекулярных соединений для совершенствования лекарственных форм и оптимизации технологического процесса // Химико-фармацевтический журнал. 2005. Т. 39. № 1. С. 22–28. [Voskoboynikova I. V., Avakjan S. B., Sokol'skaja T. A., Tjuljaev I. I., Bagirova V. L., Kolhir V. K., Sakovich G. S. Sovremennye vspomogatel'nye veshhestva v proizvodstve tabletok. Ispol'zovanie vysokomolekulyarnyh soedinenij dlya sovershenstvovaniya lekarstvennyh form i optimizacii tehnologicheskogo processa // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2005. T. 39. № 1. S. 22–28.]
20. *Кугач В. В., Костантин Ж.* Микрокристаллическая целлюлоза в производстве таблеток // Вестник фармации. 2006. № 2. С. 72–79. [Kugach V. V., Kostantin Zh. Mikrokrystallicheskaja celluloza v proizvodstve tabletok // Vestnik farmacii. 2006. № 2. S. 72–79.]
21. *Chang D., Chang R.-K.* Review of Current Issues in Pharmaceutical Excipients // Pharmaceutical Technology. 2007. P. 1–7.
22. *Mohanachandran P. S., Sindhumol P. G., Kiran T. S.* Superdisintegrants: An overview // International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2011. V. 6(1). P. 105–109.
23. *Хомяк Н., Хомяк Е.* 3-Д эффект препарата Найз: как особенности фармакокинетики помогают справиться с болью // Фармацевт Практик. 2017. № 03. С. 32–34. [Homjak N., Homjak E. 3-D jeffekt preparata Najz: kak osobennosti farmakokinetiki pomagajut spravljat'sja s bol'ju // Farmacevt Praktik. 2017. № 03. S. 32–34.]
24. *Kyron T-314 (Polacrilin Potassium).* Available at: http://www.corelpharmachem.com/kyron_t314.htm (accessed 11.06.2018).
25. *Тенцова А. И., Терёшкина О. И., Рудакова И. П., Самылина И. А., Гуськова Т. А.* Современные биофармацевтические аспекты вспомогательных веществ // Фармация. 2012. № 7. С. 3–6. [Tencova A. I., Terjoshkina O. I., Rudakova I. P., Samyлина I. A., Gus'kova T. A. Sovremennye biofarmaceuticheskie aspekty vspomogatel'nyh veshhestv // Farmacija. 2012. № 7. S. 3–6.]
26. *Shihora H., Panda S.* Superdisintegrants, Utility in Dosage form: A Quick Review // Journal of Pharmaceutical Science & Bioscientific Research. 2011. V. 1(3). P. 148–153.
27. *Zhao N., Augsburg L. L.* The influence of swelling capacity of super disintegrants in different pH media on the dissolution of hydrochlorothiazide from directly compressed tablets // AAPS Pharm Sci-Tech. 2005. V. 6(1). P. 120–126.
28. *Баласубраманиам Д., Би Т.* Влияние дезинтегрантов быстрого действия на скорость растворения твердых лекарственных форм перорального применения // Фармацевтическая отрасль. 2010. № 4(21). С. 91–99. [Balasubramaniam D., Bi T. Vlijanie dezintegrantov bystrogo dejstva na skorost' rastvorenija tverdyh lekarstvennyh form peroral'nogo primeneniya // Farmaceuticheskaja otrasl'. 2010. № 4(21). S. 91–99.]
29. *Ghenge G., Pande S. D., Ahmad A., Jejurkar L., Birari T.* Development and characterisation of fast disintegrating tablet of Amlodipine besylate using mucilage of plantago ovata as a natural superdisintegrant // International Journal of Pharm Tech Research. 2011. V. 3. P. 938–945.
30. *Rajesh Y. V., Balasubramaniam J., Bindu K., Sridevi R., Swetha M., Rao V. U.* Impact of superdisintegrants on efavirenz release from tablet formulations // Acta Pharm. 2010. V. 60. P. 185–195.
31. *Balasubramaniam J., Bee T.* Influence of Superdisintegrants on the Rate of Drug Dissolution from Oral Solid Dosage Forms // Pharmaceutical Technology. 2009. V. 2009 Supplement, Issue 1. Available at: <http://www.pharmtech.com/influence-superdisintegrants-rate-drug-dissolution-oral-solid-dosage-forms> (accessed 11.06.2018).
32. *Forxiga (dapagliflozin).* Assessment report. European Medicines Agency. 2012. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002322/WC500136024.pdf (accessed 11.06.2018).
33. *Chitra K. P., Eswaraiyah M. C., Basaveswararao M. V.* Effect of various superdisintegrants on immediate release formulations of SGLT2 inhibitor dapagliflozin // International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences. 2017. V. 5(1). P. 61–72.
34. *Ajaykumar B., Babu R., Y., Sasikanth K., Laxmi Aswini G., Srinivas D.* Study on Influence of Super Disintegrants and Lubricants on the Dissolution Rate of Atenolol Tablets // Res. J. Chem. Env. Sci. 2013. V. 1(4). P. 52–55.
35. *Balasubramaniam J., Bindu K., Rao V. U., Ray D., Haldar R., Brzeczko A. W.* Effect of Superdisintegrants on Dissolution of Cationic Drugs // Dissolution Technologies. 2008. V. 15(2). P. 18–25.
36. *Gohel M. C., Parikh R. K., Brahmabhatt B. K., Shah A. R.* Improving the Tablet Characteristics and Dissolution Profile of Ibuprofen by Using a Novel Coprocessed Superdisintegrant: A Technical Note // AAPS Pharm SciTech. 2007. V. 8(1). Article 13. P. E1–E6.
37. *Patil C., Das S.* Effect of various superdisintegrants on the drug release profile and disintegration time of Lamotrigine orally disintegrating tablets // African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2011. V. 5(1). P. 76–82.
38. *Pahwa R., Sharma S., Rana A.S., Garg A., Singh I.* Emergence of Natural Superdisintegrants in the Development of Orally Disintegrating Tablets // Indo Am. J. Pharm. Sci. 2016. V. 3(8). P. 777–787.

УДК 615.014.24

ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ НАЗАЛЬНОГО СПРЕЯ НАЛТРЕКСОНА ГИДРОХЛОРИДА

Ю. М. Домнина^{1,2}, С. А. Кедик^{1,2}, В. В. Суслов^{1,2*}, Е. А. Шняк^{1,2}

Резюме. Работа посвящена созданию назального спрея налтрексона гидрохлорида. Налтрексон в дозах 3–5 мг/сут воздействует на опиоидный рецептор фактора роста (OGFr) и толл-подобный рецептор 4, что делает его перспективным средством для применения в комплексной терапии аутоиммунных заболеваний и состояний, вызванных ослабленным иммунитетом. Для предотвращения вытекания препарата из полости носа в его состав был введен термочувствительный полуксамер Kolliphor® P 407. Изучена динамическая вязкость модельных образцов в диапазоне температур 7–37 °С. Исследована скорость диализа и степень высвобождения налтрексона. Подобран оптимальный состав для создания комфортного в применении препарата «Налтрексона гидрохлорид, спрей назальный», 25 мг/мл.

Ключевые слова: налтрексона гидрохлорид, низкие дозы налтрексона, назальный спрей, полимеры, вязкость.

RATIONALE FOR THE SELECTION OF AUXILIARY COMPONENTS FOR THE NALTREXONE HYDROCHLORIDE NASAL SPRAY

Y. M. Domnina^{1,2}, S. A. Kedik^{1,2}, V. V. Suslov^{1,2*}, E. A. Shnyak^{1,2}

Abstract. The work is devoted to the development of nasal spray containing naltrexone hydrochloride. Naltrexone in doses of 3–5 mg/day acts on the opioid growth factor receptor (OGFr) and toll-like receptor 4 that makes it promising for use in the complex therapy of autoimmune diseases and conditions caused by impaired immunity. To prevent leakage of the drug from the nasal cavity, the thermosensitive poloxamer (Kolliphor® P 407) was introduced into its composition. The dynamic viscosity was studied of model samples in the temperature range of 7–37 °C. The rate of dialysis and the degree of release was investigated of naltrexone. Selected the optimal composition to create a comfortable to use drug «Naltrexone hydrochloride, nasal spray», 25 mg/ml.

Keywords: naltrexone hydrochloride, low dose naltrexone, nasal spray, polymers, viscosity.

1 – «МИРЭА – Российский технологический университет», 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, 86

2 – АО «Институт фармацевтических технологий», 121353, Россия, г. Москва, Сколковское ш., д. 21, офис 1

1 – «MIREA – Russian Technological University», 86, Vernadscogo av., Moscow, 119571, Russia

2 – Institute of pharmaceutical technologies, of. 1, 21, Skolkovskoe highway, Moscow, 121353, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: suslov@ipt.ru.com

ВВЕДЕНИЕ

Налтрексон – антагонист опиоидных рецепторов, был синтезирован в 1963 году и активно применяется в качестве перорального средства для лечения опиоидной и алкогольной зависимостей в дозировке 50–100 мг/сут. [1]. В дальнейшем было установлено, что налтрексон способен блокировать ζ -опиоидный рецептор или опиоидный рецептор фактора роста (OGFr) и толл-подобный рецептор 4 (TLR4) [2]. Эти свойства дают возможность использовать налтрексон в качестве средства для терапии хронического болевого синдрома, различных аутоиммунных и онкологических заболеваний (таблица 1) [2, 3]. В большинстве исследований для этих целей применялось пероральное введение налтрексона в дозировке 3–5 мг/сут, получившей название «низкая доза налтрексона» («Low-dose-naltrexone», LDN, НДН) [2–6]. В связи с малым временем полувыведения налтрексона (около 4 ч) и весьма значительным метаболизмом при первичном прохождении через печень некоторые исследова-

тели предлагают использовать альтернативные пути для введения НДН: трансдермальный [7], назальный, сублингвальный [2, 3].

Таблица 1.

Заболевания, для терапии которых применяют низкие дозы налтрексона

№	Заболевание	Литература
1	Фибромиалгия	[2, 8, 9, 16]
2	Болезнь Крона	[2, 10, 11]
3	Рассеянный склероз	[2, 12]
4	ВИЧ инфекции	[2, 13]
5	Онкология поджелудочной железы, яичников, прямой кишки	[2, 6, 14, 15]

Перспективность использования назальной формы очевидна и подкрепляется успешным применением в клинической практике назального спрея налтрексона гидрохлорида [17], вещества близкого к налтрексону гидрохлориду по строению, и других препаратов (таблица 2) [18].

Таблица 2.

Назальные формы лекарственных препаратов

№	Торговое наименование	Действующее вещество	Производитель (Страна)
1	Narcan	Налоксон гидрохлорид	Adapt Pharma, Inc. (США)
2	(Stadol® NS)	Буторфанол	ESI Lederle Roxane Labs. (США)
3	Stimate NS	Ацетат десмопрессина	Rhone Poulenc Rorer (Франция)
4	Syneral® Nasal Solution	Нафарелин ацетат	Roche Laboratories (Швейцария)
5	Migranal	Дигидроэрготамин ДГЭ-45	Xcel Pharm (США)
6	Instany	Фентанил	Nycomed Pharma (Швейцария)
7	Suprefact	Бусерелин	Sanofi-Aventis (Франция)
8	DDAVP® Nasal Spray	Ацетат десмопрессина	Ferring Pharm. (Швеция)
9	Zomig Nasal Spray	Золмитриптан	Astra Zeneca (Великобритания)

Итраназальное введение лекарственных веществ, как правило, позволяет повысить их биодоступность, исключить воздействие на них желудочного сока, пищеварительных и печеночных ферментов, повысить удобство и легкость повседневного использования [19–22]. Наряду с активным компонентом в состав назальных форм входят регуляторы вязкости, изогидричности и осмоляльности. Использование в качестве регуляторов вязкости мукоадгезивных полимеров, таких как полиакриловая кислота, карбомер, хитозан, альгинат натрия, метилцеллюлаза, карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, повышает комфортность их применения, позволяет увеличивать время контакта лекарственного препарата со слизистой оболочкой полости носа и приводит к увеличению абсорбции лекарственного вещества. Большой интерес представляет применение для этих целей так называемых умных («smart») полимеров, например, полоксамеров, растворы которых способны загустевать или формировать гели при попадании в носовую полость («in situ») за счет повышения температуры [23–25].

С целью разработки комфортного в применении назального спрея налтрексона гидрохлорида, обеспечивающего его поступление в организм человека в дозе 3–5 мг/сут, были изучены физико-химические свойства составов, содержащих полоксамер Kolliphor 407.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали следующие вещества: налтрексона гидрохлорид (Aspenn Oss B.V., Нидерланды, серия L00037915, годен до 09.07.2020 г.), полоксамер Kolliphor 407 (Sigma-Aldrich, США, № 62035), лимонная кислота х.ч. (Химмед, Россия), натрия хлорид х.ч. (Хим-

мед, Россия), бензалкония хлорид (Unilab chemicals and pharmaceuticals Pvt. Ltd., India, USP), вода очищенная (ФС 2.2.0020.15).

Приготовление композиций 1–3 (таблица 3) осуществляли по общей методике. Для приготовления 100 мл препарата: навеску полоксамера Kolliphor® P 407 смешивали с очищенной водой объемом 50 мл, предварительно охлажденной до 5–10 °С и выдерживали при 5–10 °С в течение 12 ч. Затем навески налтрексона гидрохлорида, лимонной кислоты и гидроксида натрия растворяли в очищенной воде объемом 40 мл. Приготовленные растворы смешивали и доводили объем до 100 мл.

Таблица 3.

Состав и свойства модельных композиций

Компоненты	№ образца		
	1	2	3
Налтрексона гидрохлорид, г	2,5	2,5	2,5
Полоксамер Kolliphor® P 407, г	13,0	14,0	15,0
Лимонная кислота безводная, г	0,01	0,01	0,01
Натрия хлорид, г	0,2	0,2	0,2
Бензалкония хлорид, г	0,006	0,006	0,006
Вода очищенная (ФС 2.2.0020.15)	до 100 мл	до 100 мл	до 100 мл
pH	5,00	4,80	5,08

Измерение значений динамической вязкости проводили при изменении температуры 7–37 °С методом ротационной вискозиметрии с помощью вискозиметра Брукфильда DV2T (Brookfield engineering laboratories inc., США), снабженного термостатируемой измерительной ячейкой типа коаксиальных цилиндров с использованием адаптера для малых образцов и шпиндель SC4-16, который имел следующие геометрические параметры: диаметр – 6,99 мм, высота 20,7 мм. Исследуемый образец объемом 5 мл помещали в измерительную ячейку и термостатировали в течение 20 мин. Измерения проводились в диапазоне скоростей сдвига от 0,28 с⁻¹ до 58,0 с⁻¹, которые соответствовали крутящему моменту 10–90%.

Измерение pH проводили в соответствии с фармакопейной статьей (ОФС.1.2.1.0004.15) с использованием прибора pH-метра (Эксперт, Россия) с электродом стеклянным комбинированным ЭСК-10601 (Измерительная техника, Россия).

Оценку распределения капель спрея по размерам проводили методом лазерной дифракции с помощью анализатора частиц Malvern Spraytec (Malvern Panalytical, Великобритания). Распыление осуществляли с помощью флаконов из непрозрачного стекла объемом 5 мл с назальными распылителями с объемом дозы 100 мкл (Aptar pharma, Германия).

Определение степени высвобождения налтрексона гидрохлорида из композиций проводили методом диализа с использованием полупроницаемой мембраны (Servapor dialysis tubing, MWCO 12000 – 14000 RC, Германия) при температуре $35 \pm 0,1$ °C. Анализ проводили в пяти повторностях для каждой композиции и контрольного раствора.

В диализный мешок размером 50×29 мм помещали 1,6 мл анализируемого образца предварительно смешанного с 3,4 мл фосфатно-буферного раствора с pH 7,4 нагретого до 35 °C (ОФС.1.3.003.15). Затем, диализный мешок с образцом помещали в среду высвобождения объемом 100 мл установленную в водяной бане. Среда высвобождения имела показатель pH равный 5,5, соответствующий назальному секрету, и следующий состав: хлорид натрия – 7,45 г/л, хлорид калия – 1,29 г/л, хлорид кальция – 0,32 г/л. Через заданные интервалы времени 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180 минут отбирали пробы объемом 5 мл. После отбора пробы объем среды высвобождения восполняли, добавляя 5 мл среды высвобождения, подогретой до $35 \pm 0,3$ °C. Содержание налтрексона гидрохлорида в диализате определяли методом спектрофотометрии на спектрофотометре (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis, Малайзия) при длине волны 281 нм.

Количество налтрексона, перешедшего в среду высвобождения рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{C \cdot V}{W} \cdot 100\%$$

где C – концентрация налтрексона в среде высвобождения, найденная по градуировочному графику, мг/мл; V – объем среды высвобождения, мл; W – навеска налтрексона, взятого для испытания, мг.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании данных о значении температуры гелеобразования для водных растворов полоксамера 407 [26] для приготовления композиций был выбран диапазон его концентраций 13–15%. С целью обеспечения стабильности композиций при хранении, в их состав была введена лимонная кислота для поддержания значений pH=4–5. При таких значениях pH водные

растворы налоксона гидрохлорида, вещества близкого по строению к налтрексону гидрохлориду, обладают стабильностью в течение 4 лет [27].

Все приготовленные составы при температуре 15–25 °C, соответствующей температуре хранения и распыления лекарственного препарата, представляли собой жидкости с динамической вязкостью от 10 мПа·с до 40 мПа·с, что позволяет их распылять с помощью назальных распылителей. При повышении температуры до 30–35 °C, характерной для носовой полости [28], вязкость образца №1 повышается до значений 20 мПа·с, а для образцов № 2 и 3 до 65 и 70 мПа·с, соответственно (рисунок 1). Такое увеличение вязкости будет предотвращать самопроизвольное вытекание препарата из носовой полости и обеспечивать длительный контакт препарата со слизистой оболочкой.

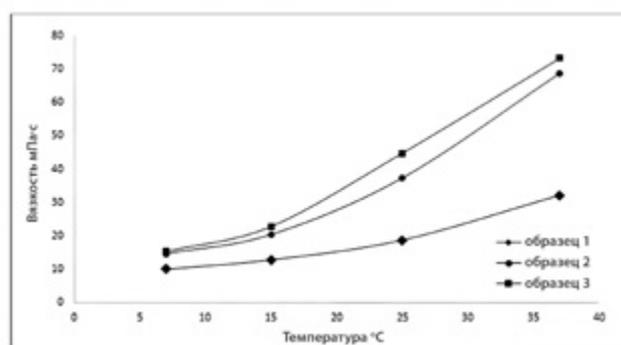


Рисунок 1. Зависимость динамической вязкости от температуры для образцов 1 – 3 при скорости сдвига 20 с^{-1} и крутящем моменте 65%

Для предотвращения попадания спрея в нижние дыхательные пути размер капель должен превышать 10 мкм и, как правило, состав спрея и характеристики средств распыления (насадок) подбирают таким образом, чтобы средний диаметр капель спрея находился в диапазоне от 10 мкм до 200 мкм [29]. Исследуемые нами композиции 1, 2, 3 при распылении через выбранные насадки формировали капли, соответствующие этому требованию, и имели распределение частиц по размерам от 50 до 180 мкм (рисунок 2, таблица 4) и средний объемный диаметр от $108,05 \pm 1,25$ мкм, $120,40 \pm 1,32$ мкм и $104,86 \pm 1,27$ мкм, соответственно.

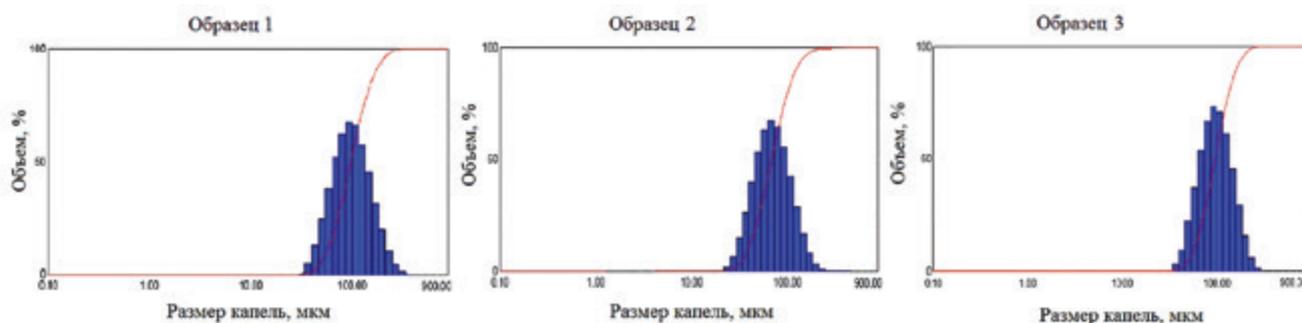


Рисунок 2. Распределение капель по размерам для образцов 1 –3

Таблица 4.

Характеристики капель образцов 1–3

№ образца	Наибольший диаметр частиц во фракции, мкм			Средний объемный диаметр, мкм
	DV (10)	DV (50)	DV (90)	
1	56,02±0,67	97,09±0,80	171,05±1,03	108,05±1,25
2	80,62±0,84	112,7±1,12	167,90±1,28	120,40±1,32
3	57,72±0,59	96,18±0,77	160,70±1,30	104,86±1,27

Изучение процесса высвобождения налтрексона гидрохлорида через диализную мембрану из исследуемых композиций и контрольного 2,5% раствора налтрексона гидрохлорида показало, что введение в состав полоксамера снижает скорость диализа и степень высвобождения (таблица 5, рисунок 3). Оптимальным составом, обеспечивающим достаточно высокую скорость высвобождения налтрексона гидрохлорида (68% за 3 часа), имеет образец № 2.

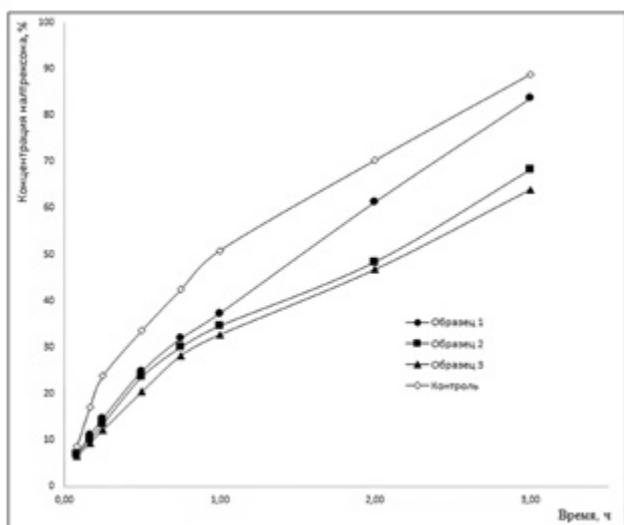


Рисунок 3. Кинетика высвобождения налтрексона гидрохлорида через полупроницаемую мембрану

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения работы были изучены составы, содержащие налтрексона гидрохлорид, при нормальных условиях пригодные для назального применения в виде спрея и обладающие повышенной вязкостью при температурах характерных для полости носа. Подобран оптимальный состав

для создания комфортного в применении препарата «Налтрексона гидрохлорид, спрей назальный», 25 мг/мл. Данный состав пригоден для распыления через стандартные насадки, обладает повышенной вязкостью при 35–37 °С и обеспечивает достаточно высокую скорость высвобождения налтрексона гидрохлорида.

Авторы выражают благодарность младшему научному сотруднику предприятия ФГУП «ВНИИФТРИ» Беленькому Д. И. за оказанную помощь при проведении измерений на приборе Malvern Spraytec (Великобритания).

ЛИТЕРАТУРА

1. Resnick R. B. et al. Studies of EN-1639A (naltrexone): a new narcotic antagonist // American Journal of Psychiatry. 1974. V. 131. № 6. С. 646–650.
2. Patten D. K., Schultz B. G., Berlau D. J. The Safety and Efficacy of Low-Dose Naltrexone in the Management of Chronic Pain and Inflammation in Multiple Sclerosis, Fibromyalgia, Crohn's Disease, and Other Chronic Pain Disorders // Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. 2018. V. 38. № 3. С. 382–389.
3. Elsegood L. The LDN Book: How a Little-Known Generic Drug – Low Dose Naltrexone – Could Revolutionize Treatment for Autoimmune Diseases, Cancer, Autism, Depression, and More. – Chelsea Green Publishing, 2016.
4. Ringerike T., Pike E., Nevjar J., Klemp M. NIPH systematic reviews: executive summaries, The Use of Naltrexone in Low Doses Beyond the Approved Indication, Knowledge Centre for the Health Services at The Norwegian Institute of Public Health (NIPH) Copyright (c)2015 by The Norwegian Institute of Public Health (NIPH). Oslo, Norway, 2015.
5. Brown N., Panksepp J. Low-dose naltrexone for disease prevention and quality of life, Med. Hypotheses. 2009. V. 72. P. 333–337.
6. Donahue R. N., McLaughlin P. J., Zagon I. S. Low-dose naltrexone suppresses ovarian cancer and exhibits enhanced inhibition in combination with cisplatin, Exp. Biol. Med. (Maywood, NJ). 2011. V. 236 P. 883–895.
7. Dodou K., Armstrong A., Kelly I., Wilkinson S., Carr K., Shattock P. et al. Ex vivo studies for the passive transdermal delivery of low-dose naltrexone from a cream; detection of naltrexone and its active metabolite, 6beta-naltrexol, using a novel LC Q-ToF MS assay, Pharm. Dev. Technol. 2015. V. 20. P. 694–701.
8. Данилов А. Б. Фибромиалгия: новые возможности терапии // РМЖ. 2010. Т. 18. № 16. С. 998–1003. [Danilov A. B. Fibromyalgia: novy'e vozmozhnosti terapii // RMZh. [Fibromyalgia: new treatment options // RMJ.] 2010. V. 18. № 16. P. 998–1003.]
9. Ramanathan S., Panksepp J., Johnson B. Is fibromyalgia an endocrine / endorphin deficit disorder? Is low dose naltrexone a new treatment option? // Psychosomatics. 2012. V. 53. № 6. С. 591–594.

Таблица 5.

Высвобождение налтрексона гидрохлорида через полупроницаемую мембрану

№ образца	Высвобождение, % от исходной концентрации, через время:							
	1/12 ч	1/6 ч	1/4 ч	1/2 ч	3/4 ч	1 ч	2 ч	3 ч
Контроль	8,6±0,62	17,1±0,57	23,8±0,80	33,6±0,43	42,4±0,72	50,8±0,64	70,3±0,60	88,8±1,08
1	6,9±0,74	11,1±1,20	14,7±0,70	24,8±0,82	31,9±0,83	37,3±1,31	61,3±0,83	83,6±1,16
2	7,0±0,48	10,1±0,69	13,5±0,99	23,6±0,51	30,0±1,16	37,6±1,72	48,4±0,60	68,3±1,74
3	6,5±1,07	9,4±0,50	12,2±0,86	20,6±0,47	28,2±0,69	32,7±0,37	46,8±1,05	64,0±1,19

10. *Smith J. P. et al.* Low-dose naltrexone therapy improves active Crohn's disease // *The American journal of gastroenterology*. 2007. V. 102. № 4. С. 820.
11. *Parker C. E. et al.* Low dose naltrexone for induction of remission in Crohn's disease // *The Cochrane database of systematic reviews*. 2018. V. 4. P. 10–25.
12. *Agrawal Y. P.* Low dose naltrexone therapy in multiple sclerosis // *Medical hypotheses*. 2005. V. 64. № 4. С. 721–724.
13. *Yi Z. et al.* Functional modulation on macrophage by low dose naltrexone (LDN) // *International immunopharmacology*. 2016. V. 39. С. 397–402.
14. *Liu W. M. et al.* Naltrexone at low doses upregulates a unique gene expression not seen with normal doses: Implications for its use in cancer therapy // *International journal of oncology*. 2016. V. 49. № 2. С. 793–802.
15. *Li Z. et al.* Low-dose naltrexone (LDN): A promising treatment in immune-related diseases and cancer therapy // *International immunopharmacology*. 2018. V. 61. С. 178–184.
16. *Younger J., Parkitny L., McLain D.* The use of low-dose naltrexone (LDN) as a novel anti-inflammatory treatment for chronic pain // *Clinical rheumatology*. 2014. T. 33. № 4. С. 451–459.
17. *Skulberg A. K. et al.* Pharmacokinetics and-dynamics of intramuscular and intranasal naloxone: an explorative study in healthy volunteers // *European journal of clinical pharmacology*. 2018. С. 1–11.
18. *Vyas T. K. et al.* Intranasal drug delivery for brain targeting // *Current drug delivery*. 2005. V. 2. № 2. С. 165–175.
19. *Appasaheb P. S. et al.* A review on intranasal drug delivery system // *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* Oct-Dec. 2013. V. 3. № 4.
20. *Vyas T. K. et al.* Intranasal drug delivery for brain targeting // *Current drug delivery*. 2005. V. 2. № 2. С. 165–175.
21. *Lochhead J. J., Thorne R. G.* Intranasal delivery of biologics to the central nervous system // *Advanced drug delivery reviews*. 2012. V. 64. № 7. С. 614–628.
22. *Привалова А. М., Гуляева Н. В., Букреева Т. В.* Интраназальное введение перспективный способ доставки лекарственных веществ в мозг // *Нейрохимия*. 2012. Т. 29. № 2. С. 93–93. [Privalova A. M., Gulyaeva N. V., Bukreeva T. V. Intranasal'noe vvedenie perspektivny'j sposob dostavki lekarstvenny'x veshhestv v mozg // *Nejroximiya*. [Intranasal administration is a promising method of drug delivery to the brain // *Neurochemistry*.] 2012. Т. 29. № 2. P. 93–93.]
23. *Kaur P. et al.* In situ nasal gel drug delivery: A novel approach for brain targeting through the mucosal membrane // *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2016. V. 44. № 4. С. 1167–1176.
24. *Sharma N. et al.* Mucoadhesive thermoreversible nasal delivery system // *Journal of Pharmacy Research*. 2010. V. 3. С. 991–997.
25. *Karavasili C., Fatouros D. G.* Smart materials: in situ gel-forming systems for nasal delivery // *Drug discovery today*. 2016. V. 21. № 1. С. 157–166.
26. *Agnese T. et al.* Характеристики температуры, способствующей гелеобразованию различных полоксамеров // *Фармацевтическая отрасль*. 2013. № 5. С. 110–112. [Agnese T. et al. *Xarakteristiki temperatury, sposobstvuyushhej geleobrazovaniyu razlichny'x poloksamerov* // *Farmaceuticheskaya otrasl'*. [Characteristics of the temperature conducive to the gelation of various poloxamers // *Pharmaceutical industry*.] 2013. № 5. P. 110–112.]
27. *European Pharmacopoeia 8.0 ed.* 2014. 2820 c.
28. *Lindemann J. et al.* Nasal mucosal temperature during respiration // *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*. 2002. V. 27. № 3. С. 135–139.
29. *Dayal P., Shaik M. S., Singh M.* Evaluation of different parameters that affect droplet-size distribution from nasal sprays using the Malvern Spraytec® // *Journal of pharmaceutical sciences*. 2004. V. 93. № 7. P. 1725–1742.

УДК 615.322

РАЗРАБОТКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО СБОРА ИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

А. М. Кутовая^{1*}, И. А. Мартыничик¹, Т. Е. Трумпе¹, Е. В. Ферубко¹, В. Н. Давыдова¹

Резюме. Разработан состав сбора гипогликемического из лекарственных растений. Определено соотношение компонентов сбора. Выбор растений основывался на наличии у них гипогликемических, диуретических, антиоксидантных, адаптогенных и иммуностропных свойств. Экспериментальное изучение гипогликемических свойств сбора в условиях глюкозотолерантного теста показало, что под действием сбора у животных повышается толерантность к углеводам. Делается вывод о перспективности дальнейшего фармакологического изучения оригинального сбора с целью разработки гипогликемического средства.

Ключевые слова: сбор из лекарственных растений, гипогликемическая активность, глюкозотолерантный тест.

DEVELOPMENT AND EXPERIMENTAL STUDY OF HYPOGLYCEMIC COMPOSITION PREPARED FROM MEDICINAL PLANTS

A. M. Kutovaya^{1*}, I. A. Martinchik¹, T. E. Trumpe¹, E. V. Ferubko¹, V. N. Davydova¹

Abstract. Experimental study of the hypoglycemic properties of composition, prepared from medicinal plants has showed in terms of glucose tolerance test. There increases in animals by loading of glucose the tolerance to carbohydrates. The conclusion about the prospects of further pharmacological study of the original composition prepared from medicinal plants is positive with the aim of developing the antidiabetic agents.

Keywords: composition prepared from medicinal plants, hypoglycemic activity, glucose tolerance test.

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», 117216, Россия, Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1, кв. 1

1 – All – Russian Research Scientific Institute of Medicinal and Aromatic Herbs, 7/1, Grina str., Moscow, 117216, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: linia25@mail.ru
Тел.: 8 (495) 996 10 97

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в изучении этиологии патогенеза и лечении сахарного диабета, поиск и разработка новых препаратов для лечения и профилактики этого заболевания продолжает оставаться одним из актуальнейших вопросов медицинской практики [1].

В ТОП списке доля российских компаний незначительная. Одной из основных целей «Стратегии развития фармацевтической промышленности РФ до 2020 года», разработанной Министерством промышленности и торговли РФ и утвержденной Правительством РФ 2009 году, является увеличение доли российских производителей на отечественном рынке фармацевтической продукции до 50% (в настоящее время 80% рынка удерживается препаратами иностранного производства). С этой целью в Стратегии также предусмотрены и меры стимулирования инвестиций в НИОКР [2].

Многие исследователи и создатели новых препаратов обратили внимание на существование некото-

рых антидиабетических растений и растительных составов в народной медицине. Больных и врачей в них привлекают мягкость действия, отсутствие выраженных побочных явлений и противопоказаний.

В России антидиабетические растения широко применяются в сочетании с диетой, инсулинотерапией, дозированными физическими нагрузками, способствуя снижению суточной потребности в инсулине или таблетированных средствах. У больных II типом диабета роль фитотерапии более значима в начальный период – латентный, легкой степени тяжести – в виде монотерапии, обеспечивая стабилизацию или даже регресс заболевания. В настоящее время в медицинской практике используется более 200 лекарственных растений с сахароснижающим эффектом [3].

Целью разработки сбора явилось расширение арсенала средств из лекарственных растений с гипогликемическим действием. Выбор растений для профилактики и лечения сахарного диабета основывался на наличии у них гипогликемических, диуретических, антиоксидантных, адаптогенных и иммуностропных

свойств, а также на присутствии витаминов и микроэлементов, участвующих в нормализации обменных процессов при сахарном диабете [4].

На основании предварительного фитохимического исследования, определено соотношение компонентов сбора: побеги черники обыкновенной 20%, створки фасоли обыкновенной 20%, трава галеги лекарственной 15%, трава горца птичьего 15%, корни лопуха большого 15%, плоды шиповника коричневого 15%. Компоненты сбора и их содержание были подобраны на основании изучения литературных данных об используемых при сахарном диабете лекарственных растениях [5–9]. Входящие в их состав биологически активные вещества, такие как флавоноиды, дубильные вещества, витамины, легкоусвояемые сахара, инулин, макро- и микроэлементы оказывают разнонаправленное действие на организм человека и обуславливают регулирующее обмен веществ действие.

1. Черника (*Vaccinium myrtillus* L.). В листьях этого растения обнаружены дубильные вещества (18–20%), сапонины (2,2–2,8%), органические кислоты (галловая, бензойная, лимонная, яблочная, уксусная, щавелевая, винная), арбутин (1,6%), гидрохинон, сахара, аскорбиновая кислота, минеральные вещества. Важными в биологическом отношении веществами являются гликозиды – миртиллин (1%) и неомиртеллин (2%) [6], наличие которых объясняют сахароснижающее действие побегов черники. Черника способна воспроизводить эффект инсулина и нормализовать усвоение глюкозы, стимулировать регенерацию β -клеток поджелудочной железы [10]. Препараты листьев черники оказывают кардиотоническое, мочегонное, желчегонное, противовоспалительное и противогнилостное действие. В эксперименте спиртоводный экстракт и настой из листьев черники уменьшают содержание сахара в крови у кроликов с гипергликемией [5].

2. Фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L.). В створках фасоли обыкновенной найдены бетаин, аргинин, триптофан, тирозин, лейцин, лизин, аспарагин, холин, гемицеллюлоза, флавоноиды – производные кверцетина [8]. В лекарственных целях, при легких случаях диабета, применяют экстракт из хорошо созревших стручков фасоли. Фазеолин, который подобно инсулину уменьшает уровень сахара в крови, до 50% увеличивает диурез и повышает выносливость диабетиков [5]. Экспериментально доказано, что водный отвар шелухи бобов фасоли снижает уровень сахара в крови на 30–40% и увеличивает диурез [9].

3. Галега лекарственная (*Gallega officinalis* L.) содержит алкалоиды, из которых выделены d-1-пеганин, 2-3-(α -окситриметил)-хиназолон-4; сапонины [7], а также гуанидиновый алкалоид галегин, увеличивающий содержание гликогена в печени и уменьшающий активность амилазы и инсулиназы [1].

4. Горец птичий (спорыш) (*Polygonum aviculare* L.). В траве горца птичьего обнаружены флавоноиды (авикулярин, гиперозид, кверцитрин и изокверцетрин), дубильные вещества (до 0,4%), витамины (аскорбиновая кислота – до 0,9%), соединения кремневой кислоты (до 4,5%), а также смолы, эфирные масла, слизи, жиры, сахара [8]. Трава горца птичьего отличается многосторонними фармакологическими свойствами, она также способствует синтезу инсулина и оптимизации его действия на тканевом уровне, так как содержит цинк, который стимулирует синтез инсулина и активирует иммунную систему, наряду с этим оказывает мочегонное действие, что способствует нормализации водно-солевого обмена. [5].

5. Лопух большой (*Arctium lappa* L.). Корни этого растения содержат эфирное масло (до 0,2%), дубильные и горькие вещества, полисахарид инулин – до 45%, протеины – 12,3%, пальмитиновую, стеариновую кислоты, ситостерин и стигмастерин, жироподобные вещества 0,8% [6]. Корни лопуха являются лучшим средством, восстанавливающим обменные процессы. Галеновые препараты корня лопуха большого увеличивают диурез, оказывают небольшое желчегонное действие, стимулируют действие протеолитических ферментов поджелудочной железы и регулируют ее инсулинообразующую функцию, улучшают минеральный обмен. Экстракт корней лопуха нормализует состав крови, снижает в ней концентрацию сахара [5].

6. Шиповник коричный (*Rosa cinnamomea* L.). Шиповник коричный является источниками витаминов, органических кислот и других БАВ повышающих защитные силы организма. Плоды шиповника содержат витамин С (в среднем 2–3%) провитамин А, витамины Р, В2, К, Е. Кроме того плоды шиповника содержат различные сахара, пектины, лимонную и яблочную кислоты, минеральные элементы, а из специфически действующих веществ флавоноиды, дубильные вещества, эфирное масло. Витамин С, содержащийся в шиповнике, регулирует в организме окислительно-восстановительные процессы, при этом повышается устойчивость организма к инфекциям, стимулирует обмен веществ [8].

Сбор получали из растительного сырья соответствующего требованиям нормативно-технической документации путем механического перемешивания предварительно высушенных и измельченных по отдельности до размера 3 мм побегов черники обыкновенной, створок фасоли обыкновенной, травы галеги лекарственной, травы горца птичьего, корня лопуха большого, плодов шиповника. Измельченное сырье помещали в смесители и тщательно перемешивали для получения равномерной массы, растительную пыль отсеивали сквозь сито с диаметром отверстий 0,18 мм [11]. Готовый сбор фасовали в бумажные фильтр-пакеты по 2,0 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки гипогликемической активности оригинального сбора из лекарственных растений использовали глюкозотолерантный тест (ГТТ), который является наиболее распространенным исследованием в эндокринологии для диагностики нарушения обмена углеводов у больных сахарным диабетом. опыты были выполнены на 16 белых нелинейных крысах-самцах массой 190–220 г. Производитель животных – филиал «Андреевка» ФГБНУ НЦБМТ ФМБА России (Московская область). Крыс содержали в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе в стандартных пластиковых клетках (8 крыс на клетку) при свободном доступе к воде и корму при температуре 20–25 °С и относительной влажности не более 75% [13]. Крысы были разделены на 2 группы по 8 животных в каждой: контроль (n=8) и опытная (n=8).

Настой сбора готовили согласно инструкции: 1 фильтр-пакет (2,0 г сбора) заливали 100 мл кипящей воды в керамической посуде с плотно укуренной крышкой и настаивали 15–20 мин, затем фильтр-пакет отжимали и выбрасывали [11].

Опытным животным настой вводили внутривенно в дозировке 2,5 мл/кг в течение 4 дней. Данная доза соответствует количеству сбора по содержанию экстрактивных веществ. Контрольным животным вводили в эквивалентном объеме дистиллированную воду. На 5-й день опыта после 12–14 часового голодания (ночное время) проводили глюкозотолерантный тест. Ряд авторов полагает, что длительное голодание (свыше 14 часов) активизирует катоболические процессы, что в дальнейшем может приводить к искажению данных, полученных в ходе ГТТ. [12]. В связи с этим, кровь у крыс каждой группы брали из хвостовой вены натошак, затем после введения глюкозы в дозе 2 г/кг через 30, 60 и 90 мин. Венозную кровь отбирали в чистую пластмассовую пробирку. Все процедуры на крысах проводили в соответствии с положениями Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным [13]. Для получения сыворотки кровь центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Сыворотку замораживали в течение 7 дней при температуре –18 °С и перед анализом размораживали в холодильнике при температуре 2–3 °С. Содержание глюкозы в сыворотке крови крыс определяли глюкозооксидазным методом, используя наборы Диакон-ДС (Россия) на полуавтоматическом биохимическом анализаторе ClimaMC-15 (Испания). Результаты эксперимента обрабатывали вариационно-статистическим методом с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментов, представленные в таблице 1, показали, что у контрольных крыс после введения глюкозы характер изменения гликемической

кривой происходил следующим образом: вначале уровень глюкозы постепенно поднимался, максимальный уровень подъема наблюдали через 60 мин (8,8 моль/л), затем уровень глюкозы начинал постепенно снижаться, однако до исходных цифр не доходил. У опытных крыс, которым давали оригинальный сбор, уровень глюкозы в крови поднимался через 30 мин незначительно до 7,1 моль/л, а через 60 мин был ниже, чем в контроле на 28%, при статистически значимых результатах. Затем кривая углеводной нагрузки начинала плавно снижаться до исходных величин. Следовательно, в проведенных экспериментах было установлено, что разработанный оригинальный состав сбора, на фоне углеводной нагрузки, повышает у крыс толерантность к углеводам.

Таблица 1.

Содержание глюкозы в сыворотке крови при проведении перорального глюкозотолерантного теста.

	До введения, моль/л	Через 30 мин, моль/л	Через 60 мин, моль/л	Через 90 мин, моль/л
Контроль	5,87±1,5	7,6±0,9	8,8±2,3	6,5±0,4
Сбор	5,6±0,6	7,1±0,7	6,4±0,6*	5,8±0,7

Примечание: * – отличия от контроля достоверны при $p \leq 0,001$

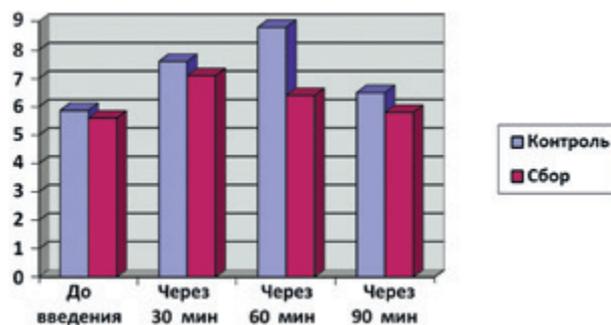


Рисунок 1. Содержание глюкозы в сыворотке крови при проведении перорального глюкозотолерантного теста

Таким образом, учитывая, что гликемическая кривая в условиях пероральной нагрузки (ГТТ) способна в определенной степени отразить резорбционную способность кишечника, гликогенсинтезирующую деятельность печени, а также воздействие на регуляцию вегетативной и эндокринной системы, можно предположить, что под действием оригинального сбора происходит усиление процессов утилизации глюкозы в организме экспериментальных животных.

Экспериментально было установлено, что разработанный нами сбор у животных в условиях углеводной нагрузки повышает толерантность к углеводам.

Для более объективного выявления гипогликемической активности у растительных препаратов, наряду с использованием теста на толерантность к глюкозе необходимо проводить обязательное изучение их действия на модели экспериментального диабета.

Таким образом, оригинальный сбор перспективен для дальнейшего фармакологического изучения с целью разработки препарата, обладающего гипогликемической активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработан оригинальный состав сбора гипогликемического, содержащий: побеги черники (20%), створки фасоли (20%), траву галеги лекарственной (15%), траву горца птичьего (15%), корень лопуха большого (15%), плоды шиповника (15%).
2. Экспериментально установлено, что разработанный оригинальный сбор у животных в условиях углеводной нагрузки повышает толерантность к углеводам.
3. Оригинальный сбор перспективен для дальнейшего фармакологического изучения с целью разработки препарата, обладающего гипогликемической активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Трумпле Т. Е. Фармакологическое изучение гипогликемических свойств некоторых лекарственных растений и фитопрепаратов // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Смоленск. 1984. С. 22. [Trumpe T. E. Farmakologicheskoe izuchenie gipoglikemicheskikh svoyst nekotorykh lekarstvennykh rastenij i fitopreparatov // Avtoreferat dissertacii na soiskanie uchenoj stepeni kandidata biologicheskikh nauk. Smolensk. 1984. P.22.]
2. Постановление Правительства Российской Федерации от 9 июня 2016 г. № 519 «О внесении изменений в федеральную целевую программу «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (Собрание законодательства Российской Федерации.) 2016. № 25. С. 3806. [Postanovlenie Pravitel'stva Rossijskoj Federacii ot 9 ijunja 2016 g. № 519 «O vnesenii izmenenij v federal'nuju celevuju programmu «Razvitie farmacevticheskoj i medicinskoj promyshlennosti Rossijskoj Federacii na period do 2020 goda i dal'nejshuju perspektivu» (Sobranie zakonodatel'stva Rossijskoj Federacii.)] [Decree of the Government of the Russian Federation from June 9 2016 № 519 «On Amendments to the Federal Targeted Program» Development of the Pharmaceutical and Medical Industry of the Russian Federation for the Period up to 2020 and Further Perspective» (Meeting of the Legislation of the Russian Federation.) 2016. № 25. P. 3806.]
3. Трумпле Т. Е. Фитотерапия сахарного диабета // В кн.: «Актуальные вопросы фитотерапии» матер. юбил. конфер. РОО «Фитотерапевтическое общество». 2002. с. 124–127. [Trumpe T. E. Fitoterapija saharnogo diabeta // V kn.: «Aktual'nye voprosy fitoterapii» mater. jubil. konfer. ROO «Fitoterapevticheskoe obshhestvo». [Trumpe T. E. Phytotherapy of diabetes mellitus // In the book: «Actual issues of phytotherapy» mater. anniversary conference RPO «Phytotherapeutic Society».] 2002. P. 124–127.]
4. Кутовая А. М., Давыдова В. Н., Мизина П. Г. Перспективы разработки сбора гипогликемического действия в комплексной терапии больных диабетом. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. М., 2016. № 6. С. 40–43. [Kutovaja A. M., Davydova V. N., Mizina P. G. Perspektivy razrabotki sbora gipoglikemicheskogo dejstva v kompleksnoj terapii bol'nyh diabetom. Voprosy biologicheskoi, medicinskoj i farmacevticheskoj himii. [Prospects for the development of collecting hypoglycemic effects in the treatment of diabetes patients. Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry.] М., 2016. № 6. P. 40–43].
5. Быков В. А., Сокольская Т. А., Зайко Л. Н. и др. Атлас лекарственных растений России / Под общей ред. В. А. Быкова. М.: ВИЛАР. 2006. С. 349 [Bykov V. A., Sokol'skaja T. A., Zajko L. N. i dr. Atlas lekarstvennykh rastenij Rossii / Pod obshhej red. V. A. Bykova. [Atlas of Medicinal Plants of Russia / Ed. V. A. Bykov.] М.: VILAR. 2006. p. 349].
6. Носов А. М. Лекарственные растения. М.: Эксмо. 2004. С. 350 [Nosov A. M. Lekarstvennye rastenija. [Medicinal plants.] М.: Jeksmo. 2004. P. 350].
7. Рабинович А. М., Рабинович С. А. Лекарственные растения России. М.: Арнебия. 2005. с. 496 [Rabinovich A. M., Rabinovich S. A. Lekarstvennye rastenija Rossii. [Medicinal plants of Russia.] М.: Arnebija. 2005. p. 496].
8. Соколов С. Я. Фитотерапия и фитотерапевтика: Руководство для врачей. М.: Медицинское информационное агенство. 2000. С. 976 [Sokolov S. Ja. Fitoterapija i fitofarmakologija: Rukovodstvo dlja vrachej. [Phytotherapy and Phytopharmacology: A Guide for Physicians.] М.: Medicinskoe informacionnoe agenstvo. 2000. P. 976].
9. Чекина Н. А., Чукаев С. А., Николаев С. М. Сахарный диабет: возможности фармакотерапии с использованием средств растительного происхождения // Вестник БГУ. 2010. № 12. С. 71–78. [Chekina N. A., Chukaev S. A., Nikolaev S. M. Saharnyj diabet: vozmozhnosti farmakoterapii s ispol'zovanijem sredstv rastitel'nogo proishozhdenija // Vestnik BGU. [Diabetes mellitus: the possibility of pharmacotherapy with the use of plant origin // Bulletin of BSU.] 2010. № 12. P. 71–78.]
10. Джафарова Р. Э., Гараев Г. С., Джафаркулиева З. С. Действие экстракта листьев черники обыкновенной на течение патологического процесса аллоксан-индуцированного сахарного диабета // Фундаментальные исследования. 2010. № 4. С. 36–43. [Dzhafarova R. Je., Garaev G. S., Dzhafarkulieva Z. S. Dejstvie jekstrakta list'ev chrniki obyknovnoj na techenie patologicheskogo processa alloksan-inducirovannogo saharnogo diabeta // Fundamental'nye issledovanija. [Effect of bilberry leaf extract on the course of the pathological process of alloxan-induced diabetes mellitus // Fundamental research.] 2010. № 4. P. 36–43.]
11. Государственная Фармакопея XIII изд. М., 2017. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2_html/HTML/ (дата обращения 14.12.2017) [Gosudarstvennaja Farmakopeja XIII izd. М., 2017. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2_html/HTML/ [State Pharmacopoeia XIII ed.] (accessed 14.12.2017)].
12. Swoap S. J., Gutilla M. J., Liles L. C., Smith R. O., Weinschenker D. The full expression of fasting-induced torpor requires beta 3-adrenergic receptor signaling // J. Neurosci. 2006. V. 26. P. 241–245.
13. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. – Страсбург. 18 марта 1986 года. [Evropejskaja konvencija o zashhite pozvonocnyh zhivotnyh, ispol'zuemyh dlja jeksperimentov ili v inyh nauchnyh celjah. – Strasburg. 18 marta 1986 goda.] [European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experiments or for other scientific purposes. - Strasbourg. March 18, 1986.]

УДК 581.81; 581.45; 582.71

МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЛИСТЬЕВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЛАБАЗНИКОВ

Н. В. Скляревская^{1*}, З. Р. Дитковская¹, Ю. А. Гладкая¹, Г. П. Яковлев¹

Резюме. Растения семейства *Rosaceae* широко используются в медицинской практике. Многие виды этого семейства, в том числе представители рода лабазник, применяются в народной медицине. Мало изученными представителями рода являются лабазник камчатский – *Filipendula kamtschatica* (Pall.) Maxim. и лабазник дланевидный – *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. *Filipendula kamtschatica* имеет тихоокеанский тип ареала, является эндемиком российского Дальнего Востока. *Filipendula palmata* широко распространен в Восточной Сибири и на Дальнем Востоке. Оба вида легко культивируются. В надземных частях растений содержатся различные группы биологически активных веществ: соединения полифенольной природы (дубильные вещества, флавоноиды, фенольные кислоты); эфирные масла, тритерпеновые соединения, витамины, аминокислоты, полисахариды. *Filipendula palmata* используется в народной медицине в качестве противовоспалительного, потогонного, мочегонного, противогельминтного, вяжущего и общеукрепляющего средства, при лечении ревматизма, артериальной гипертензии, нервных расстройств, болезней верхних дыхательных путей и эпилепсии. Лабазник камчатский обладает кровоостанавливающим, противовоспалительным, болеутоляющим, вяжущим, мочегонным и противогингивальным действием. Данные о морфолого-анатомическом изучении листьев этих видов лабазника в литературе отсутствуют. Целью данной работы является разработка критериев подлинности листьев лабазника дланевидного и лабазника камчатского таких, как морфологические и анатомические признаки. Объектами исследования служили высушенные листья лабазника камчатского, заготовленные в Санкт-Петербурге и Ленинградской области от культивируемых растений в 2011–2012 гг., и листья лабазника дланевидного, собранные в 2014 г. в республике Бурятия. Внешний вид листьев изучали с помощью бинокулярной лупы, их анатомическое строение определяли путем приготовления временных препаратов, используя микроскоп «Микромед-1 ВАР 1-20». Определены основные макроскопические признаки листьев двух видов лабазника. В поверхностных препаратах эпидермис верхней стороны листьев лабазника камчатского и лабазника дланевидного морфологически отличается от эпидермиса нижней стороны. Верхний эпидермис состоит из многоугольных клеток с прямыми стенками, у лабазника камчатского местами с четковидным утолщением. Эпидермис нижней стороны состоит из клеток с извилистыми боковыми стенками. Устьица аномоцитного типа. Общими анатомическими признаками листьев являются простые толстостенные одноклеточные волоски с расширенным основанием и друзы кальция оксалата в мезофилле. Для листьев *Filipendula kamtschatica* характерны тонкостенные головчатые волоски, с 1-2-клеточной овальной головкой на 2-3-(6)-клеточной ножке. В листьях *Filipendula palmata* встречаются тонкостенные одноклеточные волоски различной длины, в мезофилле листа обнаружены секреторные клетки, идиобласты с желто-коричневым содержимым.

Ключевые слова: лабазник камчатский, *Filipendula kamtschatica*, лабазник дланевидный, *Filipendula palmata*, листья, морфологические признаки, анатомическое строение.

MORPHOLOGICAL AND ANATOMIC SIGNS OF LEAVES OF SOME SPECIES OF MEADOWSWEET

N. V. Sklyarevskaya^{1*}, Z. R. Ditkovskaya¹, Yu. A. Gladkaya¹, G. P. Yakovlev¹

Abstract. *Rosaceae* plants are widely used in medical practice. Many species of this family, including representatives of the genus Meadowsweet, are used in folk medicine. Little-known representatives of the genus are the Meadowsweet kamtschatica – *Filipendula kamtschatica* (Pall.) Maxim. and the Meadowsweet palmata – *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. *Filipendula kamtschatica* has a Pacific type of range, is endemic to the Russian Far East. *Filipendula palmata* is widely distributed in Eastern Siberia and the Far East. Both species are easily cultivated. In the aerial parts of plants contain various groups of biologically active substances: compounds of polyphenolic nature (tannins, flavonoids, phenolic acids); essential oils, triterpene compounds, vitamins, amino acids, polysaccharides. *Filipendula palmata* use in folk medicine as an anti-inflammatory, diaphoretic, diuretic, anthelmintic, astringent and restorative means, in the treatment of rheumatism, arterial hypertension, nervous disorders, upper respiratory tract and epilepsy. *Filipendula kamtschatica* has hemostatic, anti-inflammatory, analgetic, astringent, diuretic and antiscorbutic effects. Data on the morphological and anatomical study of the leaves of these species of the meadowsweet are absent in the literature. The purpose of this work is to develop criteria for the authenticity of the leaves of the Meadowsweet palmate and Meadowsweet kamchatika such as morphological and anatomical signs. The objects of the study were dried leaves of *Filipendula kamchatika* harvested in St. Petersburg and Leningrad region from cultivated plants in 2011–2012, and leaves of a *Filipendula palmata* collected in 2014 in the Republic of Buryatia. The appearance of the leaves was studied using a binocular magnifier; their anatomical structure was determined by preparing temporary preparations using a microscope «Micromed-1 VAR 1-20». The main macroscopic signs of the leaves of the two species of the *Filipendula* have been determined. In surface preparations, the epidermis of the upper side of the leaves of the Meadowsweet kamchatika and the Meadowsweet palmate morphologically differs from the epidermis of the lower side. The upper epidermis consists of polygonal cells with straight walls, in the *Filipendula kamchatika* places with a clear-shaped thickening. The epidermis of the lower side consists of cells with winding side walls. Stomata anamazing type. The general anatomical signs of the leaves are simple, thick-walled unicellular hairs with an expanded base and druses of calcium oxalate crystals in the mesophyll. For the leaves of *Filipendula kamtschatica* are characterized by thin-walled capitate hairs, with 1-2-cell oval head on 2-3-(6)-cell stem. In the leaves of *Filipendula palmata* there are thin-walled unicellular hairs of different lengths, secretory cells, idioblasts with yellow-brown content were found in the mesophyll of the leaf.

Keywords: Meadowsweet kamchatika, *Filipendula kamtschatica*, Meadowsweet palmate, *Filipendula palmata*, leaves, morphological signs, anatomical structure.

¹ – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

¹ – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., Saint-Petersbourg, 197376, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: nelly.sklyarevskaya@pharminnotech.com
Тел.: 8 (812) 499 39 00, доб. 4240

ВВЕДЕНИЕ

Растения семейства розовых – *Rosaceae* широко используются в медицинской практике. Род лабазник (*Filipendula* Mill.) – насчитывает более 19 видов, обитающих в умеренном и субарктическом поясах Северного полушария. На территории Российской Федерации, встречается 5 видов: *Filipendula camtschatica* (Pall.) Maxim. (лабазник камчатский), *F. glaberrima* Nakai (л. гладчайший), *F. palmata* (Pall.) Maxim. (л. дланевидный), *F. ulmaria* (L.) Maxim. s. l. (л. вязолистный), *F. vulgaris* Moench (л. обыкновенный). Лабазник дланевидный широко распространен на пойменных лугах, в смешанных лесах, по берегам рек Восточной Сибири и Дальнего Востока. Лабазник камчатский имеет тихоокеанский тип ареала, является эндемиком российского Дальнего Востока (Приамурье, Приморье, север Хабаровского края, юг Магаданской области, Камчатка, Сахалин, Командорские и Курильские острова). *Filipendula camtschatica* введен в культуру в России и Англии в конце XIX века. Лабазник дланевидный, как и другие представители этого рода, легко культивируется, успешно проведена его интродукция в условиях средней полосы России [4, 5, 9].

В надземных частях содержатся соединения полифенольной природы (дубильные вещества, флавоноиды, фенольные кислоты). Также обнаружены эфирные масла, витамины, аминокислоты, тритерпеновые соединения, полисахариды [2, 5–8, 10]. Установленный химический состав лабазников позволяет предположить широкий спектр биологической активности, что подтверждают данные народной медицины. *Filipendula palmata* используется в качестве противовоспалительного, потогонного, мочегонного, противогельминтного, вяжущего и общеукрепляющего средства, при лечении ревматизма, артериальной гипертензии, нервных расстройств, болезней верхних дыхательных путей и эпилепсии. Лабазник камчатский обладает кровоостанавливающим, противовоспалительным, болеутоляющим, вяжущим, мочегонным и противорвотным действием [5]. Для применения листьев лабазника дланевидного и лабазника камчатского в научной медицине необходимы сведения о подлинности сырья. Информация о морфолого-анатомическом изучении листьев этих видов лабазника в литературе отсутствует.

Целью данной работы является разработка критериев подлинности листьев лабазника дланевидного и лабазника камчатского таких, как морфологические и анатомические признаки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили образцы листьев *Filipendula kamtschatica*, заготовленные в фазу цветения от культивируемых растений в 2011–2012 гг. в Санкт-Петербурге (БИН им. В.Л. Комарова РАН) и Ленинградской области (Карельский перешеек, пи-

томник лекарственных растений СПХФУ) и листьев *Filipendula palmata*, заготовленные в период цветения в июле 2014 г. в окрестностях п. Соболиха, берег ручья Текущий Прибайкальского района республики Бурятия. Внешний вид листьев и анатомические признаки определяли в соответствии с фармакопейными методиками. Временные микропрепараты готовили согласно ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» Государственной фармакопеи РФ XIII издания [3]. В качестве включающей жидкости использовали глицерин [1]. Препараты рассматривали под микроскопом «Микромед-1 ВАР 1-20» (Россия), фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата «Canon». Снимки, представленные на рисунках, обрабатывали на компьютере в программе «Microsoft Office 2010».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Листья лабазника камчатского представлены смесью цельных или частично измельченных длинночерешковых листьев округлой или широкояйцевидной формы, пальчато-пятилопастных с неравномерно пальчато-выемчатым краем. Листья сверху голые, опушены по выступающим снизу главной и боковым первого порядка коричневым жилкам отстоящими или прижатыми щетинистыми бурыми волосками. Цвет листьев с верхней стороны зеленый, с нижней – светло-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения вяжущий.

Листья лабазника дланевидного представлены смесью цельных или частично измельченных черешковых, непарно-перисто-прерывисто рассеченных листьев: верхние сегменты крупные, в очертании сердцевидные, пальчато-пяти-семи(девяти)-лопастные. Лопасты треугольно-ланцетовидные, часто наиболее широкие в средней части, с заостренной верхушкой и крупно двоякозубчатым краем, снизу беловолочные. Боковых сегментов обычно 2–3 пары: нижние трёх-надрезанно-зубчатые и очень мелкие копьевидные сегменты, иногда последние отсутствуют. Цвет листьев – от серовато-зелёного до тёмно-зелёного. Запах своеобразный, ароматный, вкус водного извлечения горьковатый, слегка вяжущий.

В поверхностных препаратах эпидермис верхней стороны листа лабазника камчатского морфологически отличается от эпидермиса нижней стороны. Верхний эпидермис состоит из многоугольных клеток со слегка закругленными углами, местами с четковидным утолщением. Эпидермис нижней стороны состоит из клеток с извилистыми боковыми стенками. Устьица аномоцитного типа. Обе стороны листа несут волоски двух типов: головчатые, тонкостенные с 1-2-клеточной овальной головкой на 2-3-(6)-клеточной ножке и простые толстостенные одноклеточные, остроконечные с расширенным основанием. Клетки эпидермиса

вокруг основания волосков образуют розетку. В мезофилле листа, а также вдоль главных и боковых первого порядка жилок встречаются кристаллические включения в виде друз и ромбических кристаллов кальция оксалата (рисунок 1).

Лист лабазника дланевидного гипостоматический, клетки эпидермиса многоугольные прямостенные, реже слабо извилистостенные, устьичный аппарат аномоцитный. На верхней стороне вдоль края листа обнаружены толстостенные одноклеточные волоски средней длины, расширяющиеся к основанию. На нижней стороне обнаружено обилие тонкостенных длинных одноклеточных извилистых волосков, располагающиеся по всей поверхности листовой пластинки, простые одноклеточные волоски средней длины вдоль жилок, а также толстостенные волоски, расширяющиеся к основанию, с полостью. У основания волосков заметна розетка клеток эпидермиса. Толстостенные волоски располагаются преимущественно вдоль жилок и края листа, по всей пластинке встречаются редко. В мезофилле листа обнаружены секреторные клетки, идиобласты с жёлто-коричневым содержимым, друзы правильной сферической формы. На эпидермисе обнаружена желёзка с двухклеточной головкой сферической формы (рисунок 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании морфолого-анатомического изучения листьев двух видов лабазника даны характеристики внешнего вида сырья и установлены общие микродиагностические признаки: простые толстостенные одноклеточные волоски с расширенным основанием и друзы кальция оксалата в мезофилле листьев. Для листьев *Filipendula camtschatica* также характерны головчатые волоски, тонкостенные с 1-2-клеточной овальной головкой на 2-3-(6)-клеточной ножке. В листьях *Filipendula palmata* встречаются тонкостенные одноклеточные волоски различной длины, в мезофилле листа обнаружены секреторные клетки, идиобласты с жёлто-коричневым содержимым.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барыкина Р. П., Веселова Т. Д., Девятков А. Г. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М., 2004. С. 312.. [Barykina R. P., Veselova T. D., Devjatov A. G. Spravochnik po botanicheskoj mikrotehnike. Osnovy i metody. [Handbook of botanical microtechnique. Basics and methods.] М., 2004. 312 p.]
2. Высочина Г. И., Кукушкина Т. А., Шалдаева Т. М. Содержание основных групп биологически активных веществ в растениях сибирских видов *Filipendula* Mill. // Химия растительного сырья. 2014. № 2. С. 129–135. [Vysochina G. I., Kukushkina T. A., Shaldaeva T. M. Soderzhanie osnovnyh grupp biologicheski aktivnyh veshhestv v rastenijah sibirskih vidov Filipendula Mill. // Himija rastitel'nogo syr'ja.

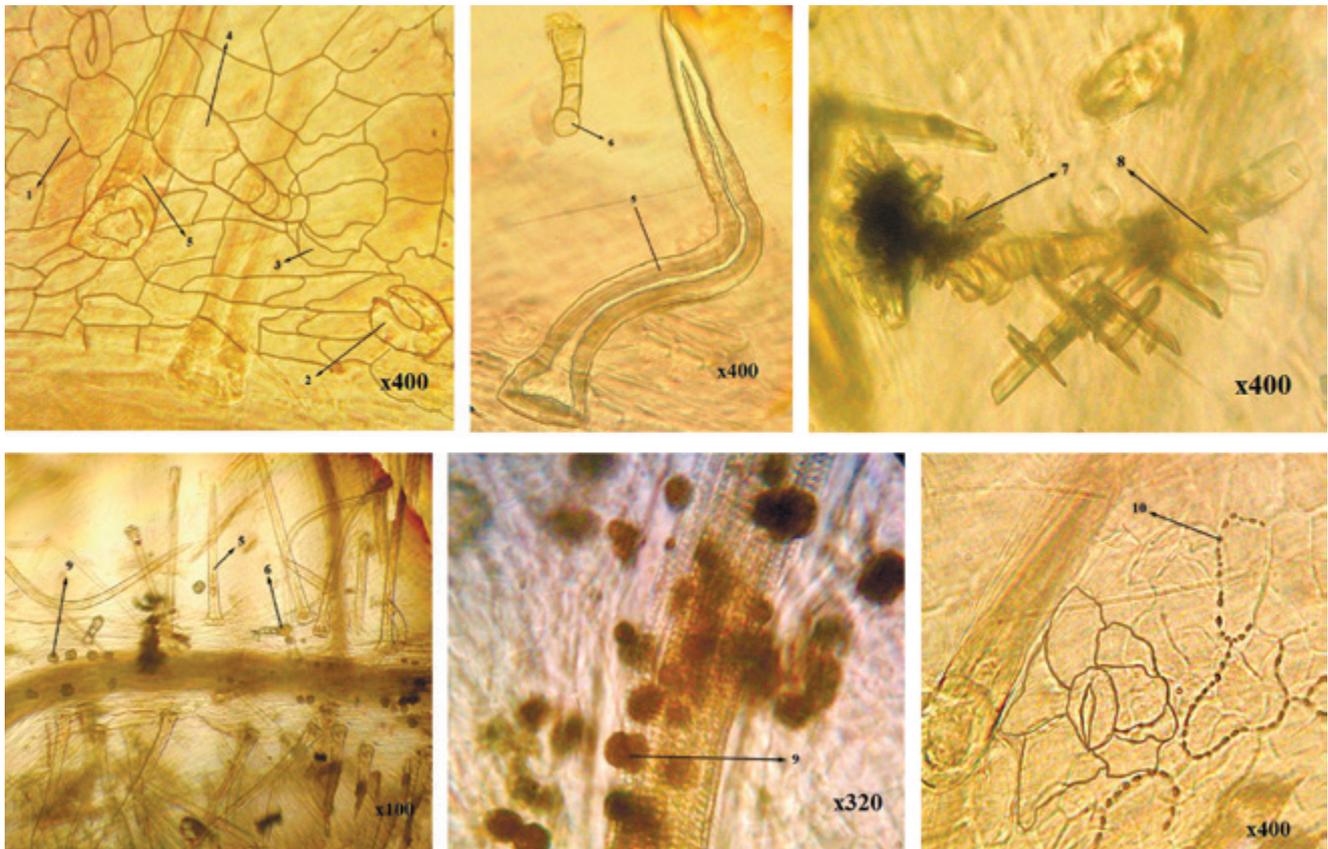


Рисунок 1. Препарат листа лабазника камчатского с поверхности:

1 – эпидермис; 2 – устьице аномоцитного типа; 3 – розетка клеток при основании головчатого волоска; 4 – тонкостенный головчатый волосок с 2-клеточной головкой на многоклеточной ножке; 5 – простой толстостенный одноклеточные волосок с расширенным основанием; 6 – тонкостенный головчатый волосок с одноклеточной головкой на многоклеточной ножке; 7 – друзы; 8 – формирующие кристаллы; 9 – кристаллоносная обкладка вдоль жилок; 10 – четковидные утолщения клеток эпидермиса.

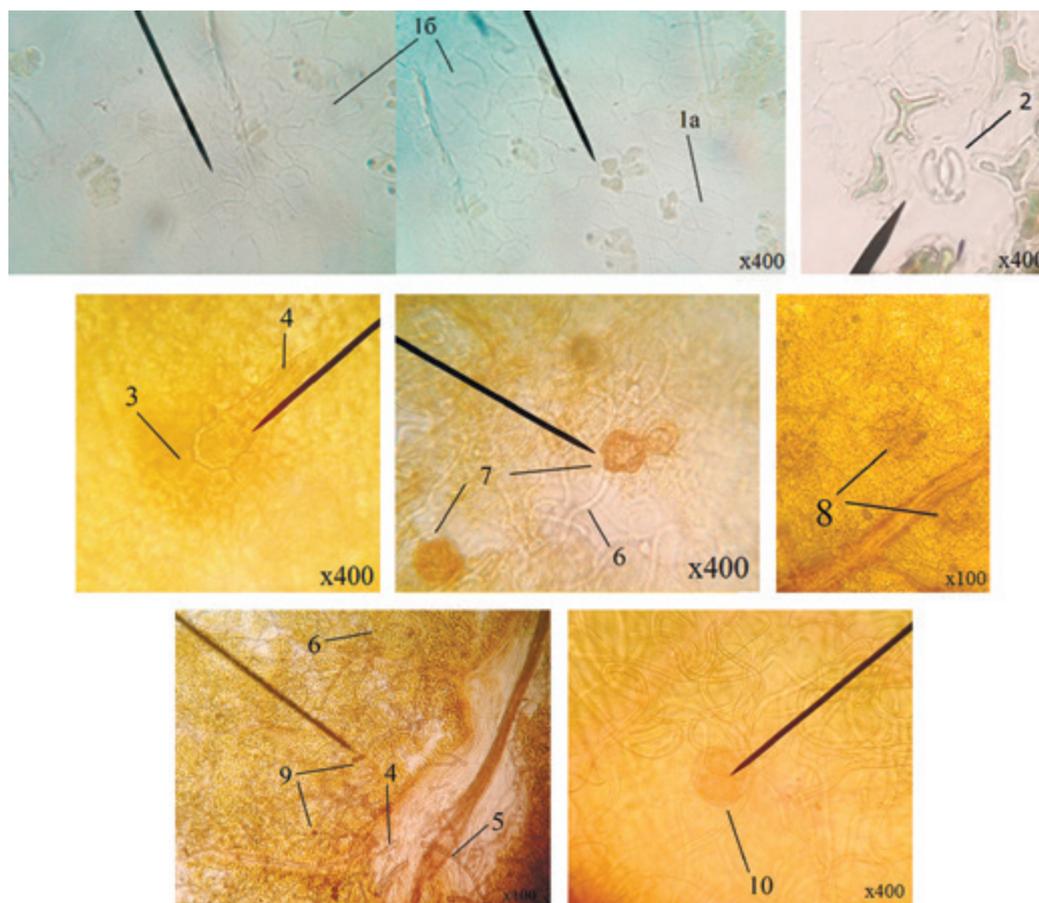


Рисунок 2. Препарат листа лабазника дланевидного с поверхности:

1а – прямостенный эпидермис, 1б – слабо извилистый эпидермис; 2 – устьичный аппарат аномоцитного типа; 3 – розетка клеток эпидермиса у основания простого волоска; 4 – простой толстостенный одноклеточный волосок; 5 – простой одноклеточный волосок средней длины; 6 – длинный тонкостенный одноклеточный извилистый волосок; 7 – идиобласты с желто-коричневым содержимым; 8 – секреторные клетки; 9 – друзы кальция оксалата; 10 – железа с двуклеточной головкой

[The content of the main groups of biologically active substances in plants of the Siberian species *Filipendula* Mill. // Chemistry of plant materials.] 2014. № 2. P. 129–135.]

- Государственная Фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 3. МЗ РФ. М., 2015. 1294 с. [Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. XIII izd. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII ed.] T. 3. MZ RF. M., 2015. 1294 p.]
- Гудкова Н. Ю. О перспективах интродукции представителей рода лабазник (*Filipendula* Mill.) в качестве источников лекарственного сырья // Сельскохозяйственная биология. 2012. № 2. С. 73–78. [Gudkova N. Ju. O perspektivah introdukcii predstavitelej roda labaznik (*Filipendula* Mill.) v kachestve istochnikov lekarstvennogo syr'ja // Sel'skohozjajstvennaja biologija. 2012. № 2. S. 73–78.]
- Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2. Семейства *Actinidiaceae* – *Malvaceae*, *Euphorbiaceae* – *Haloragaceae*. Отв. ред. Буданцев А. Л. СПб.; М., 2009. С. 197–201. [Rastitel'nye resursy Rossii: Dikorastushhie cvetkovye rastenija, ih komponentnyj sostav i biologicheskaja aktivnost'. T. 2. Semejstva *Actinidiaceae* – *Malvaceae*, *Euphorbiaceae* – *Haloragaceae*. Отв. ред. Budantsev A. L. [Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their component composition and biological activity. T. 2. Families *Actinidiaceae* – *Malvaceae*, *Euphorbiaceae* – *Haloragaceae*. Ed. ed. Budantsev A.L.] SPb.; M., 2009. P. 197–201.]
- Скляревская Н. В., Гладкая Ю. А. Фармакогностическое исследование листьев лабазника камчатского // Сборник научных трудов научно-методической конференции «II Гаммермановские чтения». СПб., 2014. С. 110–112. [Skljarevskaja N. V., Gladkaja Ju. A. Farmakognosticheskoe issledovanie list'ev labaznika kamchatskogo // Sbornik nauchnyh trudov nauchno-metodicheskoj konferencii «II Gammermanovskie chtenija». SPb., 2014. S. 110–112.]
- Скляревская Н. В., Гладкая Ю. А., Толстиков С. В. Содержание и состав углеводов листьев некоторых видов рода *Filipendula* // Бутлеровские сообщения. 2015. Т. 44. № 11. С. 141–145. [Skljarevskaja N. V., Gladkaja Ju. A., Tolstikov S. V. Soderzhanie i sostav uglevodov list'ev nekotoryh vidov roda *Filipendula* // Butlerovskie soobshhenija. 2015. T. 44. № 11. P. 141–145.]
- Скляревская Н. В., Дитковская З. Р. Фармакогностическое изучение травы лабазника дланевидного // Сборник научных трудов научно-методической конференции «III Гаммермановские чтения» 31 января – 03 февраля, 2017. СПб., 2017. С. 118–121. [Skljarevskaja N. V., Ditkovskaja Z. R. Farmakognosticheskoe izuchenie travy labaznika dlanevidnogo // Sbornik nauchnyh trudov nauchno-metodicheskoj konferencii «III Gammermanovskie chtenija» 31 janvarja – 03 fevralja 2017. [Pharmacognostic study of grass of the meadow-picker grass // Collection of scientific papers of the scientific-methodical conference «III Hammerman Readings» January 31 – February 3, 2017.] SPb., 2017. P. 118–121.]
- Kalkman C. Rosaceae. The families and genera of vascular plants. Berlin, 2004. V. 6. P. 343–386.
- Skljarevskaja N. V., Ditkovskaja Z. R. Determination of terpenoids and ascorbic acid in herb of *Filipendula palmata*. // The 22nd International Congress «Phytopharm 2018», June 25–27. Horgen and Wädenswil, Switzerland, 2018. P. 78.

УДК 615.2

РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНОГО ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИБУПРОФЕНА

Е. А. Ситникова^{1*}, С. Г. Марданлы², Е. П. Рогожникова^{1,2}

Резюме. В статье представлены материалы, методы и результаты экспериментального исследования острой токсичности воспроизведенного препарата «Ибупрофен», суспензия для приема внутрь [для детей], производства фирмы ЗАО «ЭКОлаб», Россия, серия 010109, годен до 02.2011 г., ЛП 001651 от 13.04.2012 г (МНН ибупрофен) в сравнении с референтом «Нурофен для детей», суспензия для приема внутрь, производства фирмы БСМ Лтд., Великобритания, серия IX, годен до января 2012 г П N014745/01 от 22.08.2008 г (МНН ибупрофен). По результатам исследования острой токсичности сравниваемые препараты ибупрофена являются эквивалентными. Работа будет продолжена с целью доказательства биоэквивалентности заявленных препаратов.

Ключевые слова: ибупрофен, безопасность, острая токсичность, крысы, доклинические испытания.

RESULTS OF PRECLINICAL SAFETY TESTING COMPARISON FOR IBUPROFEN DRUG PRODUCTS

E. A. Sitnikova^{1*}, S. G. Mardanly², E. P. Rogozhnikova^{1,2}

Abstract. The article contains materials, methods and results of preclinical experimental test of acute toxicity of drugs «Ibuprofen», suspension for oral administration [for children], ЛП 001651 from 13.04.2012 and referent «Nurofen for children», suspension for oral administration, П N014745/01 from 22.08.2008. Ibuprofen preparations compared were found equivalent in acute toxicity studies. The work will be continued in order to prove the bioequivalence of the claimed preparations.

Keywords: Ibuprofen, safety, acute toxicity, rats, preclinical tests.

1 – ЗАО «ЭКОлаб», 142530, Россия, Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1

2 – ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», 142611, Россия, Московская обл., г. Орехово-Зуево, ул. Зеленая, д. 22

1 – CJSC «Ecolab», 1, Budennogo str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russia

2 – State University of Humanities and Technology, 22, Zelenaya str., Moscow region, 142611, Orekhovo-Zuevo, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: lalobai@yandex.ru
Тел.: 8 (49643) 3 17 45

ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с современными требованиями для регистрации воспроизводимых лекарственных средств необходимо представить досье на лекарственный препарат, включающее в себя разделы административного характера, данные фармацевтической субстанции, являющейся действующим веществом в готовом лекарственном средстве, информацию касательного лекарственного средства, отчеты доклинических и клинических исследований.

Комплексная оценка безопасности лекарственного средства невозможна без сравнительного изучения токсичности воспроизведенного препарата и зарегистрированного аналога. Результаты собственных доклинических исследований являются основополагающим гарантом защиты жизни, здоровья и прав

добровольцев либо пациентов, участвующих в клинических исследованиях.

Данная работа была выполнена в ФГУН «Институт токсикологии» ФМБА России, г. Санкт-Петербург по заказу фармацевтического предприятия ЗАО «ЭКОлаб». Объем доклинических испытаний определялся действующими нормативными документами [1–4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было проведено экспериментальное исследование острой токсичности воспроизведенного препарата «Ибупрофен», суспензия для приема внутрь [для детей], производства фирмы ЗАО «ЭКОлаб», Россия, серия 010109, годен до 02.2011 г., ЛП 001651 от 13.04.2012 г. (МНН ибупрофен) (далее по тексту – «Ибупрофен») в сравнении с референтом «Нурофен для детей», суспензия для приема внутрь, производства фирмы БСМ Лтд.,

Великобритания, серия IX, годен до января 2012 г. П № 014745/01 от 22.08.2008 г. (МНН ибупрофен) (далее по тексту «Нурофен»).

Эксперименты были поставлены на белых нелинейных крысах-сосунках линии Wistar двухнедельного возраста обоего пола, массой 13–15 г, полученные из питомника РАМН «Рапполово» (Ленинградская обл.). Животные распределялись по группам случайным образом методом рандомизации. В качестве критериев приемлемости рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболеваний и гомогенность групп по весу тела ($\pm 10\%$).

Препараты вводили внутривенно (в/в) через металлический атравматичный зонд, который медленно погружали до желудка, в возрастающих дозах по Литчфилду-Уилкоксоу. Для достижения больших доз препарат вводили животным многократно с интервалами 30 мин на протяжении 6 ч.

Для исследования каждой дозы использовались группы по 6 животных разного пола, так как пол сосунков в этом возрасте точно не идентифицируется. Кроме того, имелись аналогичная по численности группа контрольных животных, которым тем же способом вводили эквивалентные объемы растворителя – дистиллированной воды.

Период наблюдения составлял 14 суток. Регистрируемые показатели: летальность, время гибели животных, симптоматика отравления, наблюдение общего состояния и поведения, взвешивание, потребление корма и воды, вскрытие и макроскопическое описание животных в конце исследования (эвтаназия осуществлялась в CO_2 -камере), определение массовых коэффициентов внутренних органов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Исследование острой токсичности

Далее приведены результаты исследований токсикометрии, представлены соотношения летальных эффектов в зависимости от доз при в/ж введении сравниваемых препаратов (таблица 1). Различия в значениях LD_{50} сравниваемых препаратов для крыс-сосунков не являются достоверными; отношения их LD_{50} равны 1.

Таблица 1.

Летальные эффекты в зависимости от доз в/ж введении крысам-сосункам

Доза, мг/кг	1675	3325	6650	10000	11675	13350
«Ибупрофен» $\text{LD}_{50}=8350\pm 600$ мг/кг	0/6	1/6	2/6	4/6	5/6	6/6
«Нурофен» $\text{LD}_{50}=8350\pm 600$ мг/кг	0/6	1/6	2/6	4/6	5/6	6/6

Клиническая картина интоксикации

Гибель крыс при введении высоких доз (приблизительно 3500 мг/кг) наблюдалась в течение первых суток. Первыми внешними проявлениями действия сравниваемых препаратов являлись возбуждение, одышка, атаксия, общий тремор, диарея, которые сменялись с сопорозным состоянием и комой. Через 1 час после введения препаратов появлялись судороги, которые в дальнейшем сменялись комой и параличом.

Клиническая картина интоксикации у обоих препаратов была одинаковой.

Вскрытие погибших животных выявило венозное полнокровие внутренних органов, жидкую кровь в полостях сердца, темно-бурюю кровь в просвете желудка. В стенках желудка наблюдались единичные эрозии и кровоизлияния в подслизистом слое.

После окончания эксперимента животные были подвергнуты эвтаназии.

Данные взвешиваний крыс приведены в таблицах 2 и 3. Из них видно, что у экспериментальных животных в течение 2-х недель после введения исследуемого препарата наблюдалось возрастное увеличение массы тела. Состояние животных и их поведение в целом соответствовало нормальному. Аналогичное изменение массы тела наблюдалось и в группе, получившей дистиллированную воду.

Таблица 2.

Влияние препарата «Ибупрофен» на массу тела белых крыс-сосунков при в/ж введении, г ($M\pm m$)

Время наблюдения	Контрольная группа		«Ибупрофен»	
	М	Ф	М	Ф
Фон	14,2 \pm 1,1	14,8 \pm 1,4	14,0 \pm 1,5	13,8 \pm 1,7
7 дней	27,8 \pm 2,6	29,4 \pm 1,7	28,5 \pm 1,6	27,8 \pm 1,3
14 дней	47,7 \pm 9,1	48,0 \pm 2,0	48,2 \pm 1,3	48,0 \pm 1,2

Примечание: М – самцы, Ф – самки.

Таблица 3.

Влияние препарата «Нурофен» на массу тела белых крыс-сосунков при в/ж введении, г ($M\pm m$)

Время наблюдения	Контрольная группа		«Нурофен»	
	М	Ф	М	Ф
Фон	14,2 \pm 1,1	14,8 \pm 1,4	14,3 \pm 1,2	14,0 \pm 1,5
7 дней	27,8 \pm 2,6	29,4 \pm 1,7	27,7 \pm 1,4	27,9 \pm 1,7
14 дней	47,7 \pm 9,1	48,0 \pm 2,0	46,8 \pm 1,7	47,6 \pm 1,5

Примечание: М – самцы, Ф – самки.

По данным некропсии, через 14 дней после в/ж введения, исследуемые препараты не вызывают макроскопических изменений внутренних органов и головного мозга подопытных белых крысят-сосунков, а также воспалительных изменений или раздражений в местах введения (в слизистых ЖКТ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Результаты токсикометрии, данные наблюдений за экспериментальными животными на протяжении 14 дней после острого введения, а также данные некропсии позволяют отнести исследуемые в данной работе воспроизведенный препарат «Ибупрофен» и референт «Нурофен» к V классу практически нетоксичных лекарственных веществ (таблица 4).

Таблица 4.

Степени токсичности [5]

Степень токсичности	Термин	LD ₅₀ ^{пер ос} , крысы (мг/кг)	LD ₅₀ ^{i/v*} (в/б), крысы (мг/кг)
1	Чрезвычайно токсично	<1	<0.1
2	Высокотоксично	1–50	0,1–50
3	Умеренно токсично	50–500	5–50
4	Малотоксично	500–5000	50–500
5	Практически нетоксично	5000–15000	500–1500
6	Относительно безвредно	>15000	>1500

Примечание: *Градации степеней токсичности при внутривенном пути введения определяются посредством умножения значений стандартных доз для оценки токсичности препарата при пероральном пути введения на коэффициент 0,1.

2. Проведенные исследования свидетельствуют об отсутствии различий по показателям острой токсичности, следовательно, по показателям острой токсичности воспроизведенный препарат «Ибупрофен» и референт «Нурофен» являются эквивалентными.
3. Результат доклинического исследования позволяет получить разрешение на проведение клинических исследований в разрезе доказательства биоэквивалентности воспроизведенного препарат «Ибупрофен» и референта «Нурофен».

ЛИТЕРАТУРА

4. Миронов А. Н. Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств. Т. 1. – М.: ФГБУ «НЦЭМСП», 2012. С. 942. [Mironov A. N. Rukovodstvo po doklinicheskim issledovaniyam

lekarstvennyh sredstv. [Manual for preclinical studies of drugs. (in Russian).] Т. 1. – М.: ФГБУ «НЦЭМСП», 2012. Р. 942.]

5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. С. 41–53. [Rukovodstvo po ehksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv. [Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. (in Russian).] М.: Medicina, 2005. Р. 41–53.]
6. Руководящие методические материалы по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств (Официальное издание). Части 1, 3. Фармакологический комитет. М., 1975, 1981. [Rukovodyashchie metodicheskie materialy po ehksperimental'nomu i klinicheskomu izucheniyu novykh lekarstvennyh sredstv (Official'noe izdanie). ЧАСТИ 1, 3. Farmakologicheskij komitet. [Supervisory methodical materials on experimental and clinical the study of new drugs (Official publication). V 1, 3. Pharmacological Committee. (in Russian).] М., 1975, 1981.]
7. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». [Federal'nyj zakon ot 12.04.2010 № 61-FZ «Ob obrashchenii lekarstvennyh sredstv».] [Federal law № 61 at 12.04.2010 «About the address of drugs» (in Russian).]
8. Hodge H. et al. Clinical Toxicology of Commercial Products. Acute Poisoning. Ed. IV. Baltimore, 1975. P. 427.

УДК 54.062; 615.074; 615.033

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЧЕНОГО ЙОДОМ-123 ПЕПТИДНО-БЕЛКОВОГО ПРЕПАРАТА ЦЕЛЛЕКС У КРЫС

И. Н. Уракова^{1*}, О. Н. Пожарицкая¹, В. Ю. Сухов², М. Н. Макарова¹, А. Н. Шиков¹, В. Г. Макаров¹

Резюме. Целью данной работы было изучение распределения в органах и тканях комплексного пептидно-белкового препарата Целлекс, меченого радиоизотопом ¹²³I, при однократном внутривенном введении лабораторным животным и его накопление. После однократного внутривенного введения препарата Целлекс, меченого ¹²³I, крысам установлено, что препарат характеризуется быстрым поступлением в ткани и органы. Наибольшее содержание Целлекса во всех органах и тканях наблюдалось через 15 мин после введения. Установлено, что Целлекс проникает через гематоэнцефалический барьер. В головном мозге накапливается около 6% от введенного препарата, что составляет 10% от общего количества, обнаруженного во всех органах через 15 мин после введения.

Ключевые слова: белково-пептидный препарат, радиоактивная метка ¹²³I, внутривенное введение, распределение препарата в органах и тканях.

DISTRIBUTION OF THE LABELED [¹²³I] PEPTIDE-PROTEIN DRUG CELLEX IN RATS

I. N. Urakova^{1*}, O. N. Pozharitskaya¹, V. J. Sukhov², M. N. Makarova¹, A. N. Shikov¹, V. G. Makarov¹

Abstract. The aim of this work was to study the distribution of the labeled ¹²³I peptide-protein drug Cellex in organs and tissues of rats after single intravenous injection and accumulation. After a single intravenous injection of radiolabeled [¹²³I]Cellex it was found that the drug is characterized by rapid distribution into tissues and organs. The highest content of the drug in all organs and tissues was observed in 15 minutes after its administration. It was established that the drug penetrates the blood-brain barrier and about 6% of the drug accumulates in the brain, which is 10% of the total amount of the drug found in all organs in 15 minutes after administration.

Keywords: protein-peptide medicine, radioactive label ¹²³I, intravenous administration, distribution in organs and tissues.

1 – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, к. 245

2 – ФГБВОУ ВО «Военно-Медицинская академия им. С. М. Кирова» Министерство обороны Российской Федерации, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

1 – St.-Petersburg Institute of Pharmacy, 3, Zavodskaya str., Kuzmolovsky settlement, Vsevolozhsky district, Leningrad region, 188663, Russia

2 – S. M. Kirov Military Medical Academy (MMA), 6, Lebedeva str., St.Petersburg, 194044, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: info@doclinika.ru
Тел.: 8 (812) 603 24 32

ВВЕДЕНИЕ

Целлекс – лекарственный препарат, представляющий собой органоспецифический белково-пептидный комплекс, содержащий средне- и низкомолекулярные протеины с молекулярной массой от 5 до 200 кДа, полученный из эмбриональной мозговой ткани свиней. Прямое нейрорепаративное действие Целлекса проявляется в восстановлении регенеративного потенциала клеток мозга (стимуляция экспрессии нейрональных генов, миграция нейрональных стволовых клеток и нейробластов к очагу повреждения, эпигенетическая активация теломераз и увеличение «лимита» Хейфлика) за счет наличия органо- и тканеспецифических сигнальных белков – факторов роста и дифференцировки нервных клеток, сигнальных молекул и регуляторных полипептидов [1]. Целлекс эффективен при коррекции постинсультных когнитивных нарушений в остром периоде ишемического инсульта [2].

В настоящее время препарат применяют при острых нарушениях мозгового кровообращения в остром и раннем реабилитационном периоде течения заболевания, в составе комплексной терапии [3].

Экспериментальное изучение фармакокинетических свойств лекарственных препаратов на животных является обязательным этапом для внедрения в медицинскую практику [4].

Сложность изучения фармакокинетики и распределения в органах и тканях препаратов, содержащих нуклеиновые кислоты, белки и пептиды, обусловлена: а) гидролизом компонентов препарата; б) низкой селективностью детекции компонентов вводимого в организм белкового комплекса вследствие наличия собственных белков в организме млекопитающих. Другая проблема связана с тем, что объемная метка (часто флуоресцентная), вводимая в пептид, может существенно изменить его фармакокинетику [5, 6].

Современные достижения молекулярной биологии и развитие высокочувствительных методов положили начало новому направлению – визуализации индивидуальных молекул у экспериментальных животных. Визуализация *in vivo* позволяет в приближенных к физиологическим условиям не инвазивно получить изображение и наблюдать динамику молекулярных событий на уровне целого организма [7–11].

В последние годы произошли существенные изменения в области разработки новых систем микромасштабной визуализации с пространственным разрешением и чувствительностью, которые позволяют работать с мелкими лабораторными животными, такими как мыши и крысы. Интересным и перспективным в доклинической и клинической практике является внедрение методов, детектирующих ионизирующую радиацию, в частности позитронно-эмиссионная томографии (ПЭТ) и однофотонная эмиссионная компьютерная томографии (ОФЭКТ) для визуализации *in vivo* [8–10].

ПЭТ и ОФЭКТ позволяют обнаруживать и осуществлять непрерывный мониторинг меченых радиоактивными изотопами пептидов, молекул лекарственных веществ и других молекул в дозах, не имеющих фармакологических побочных эффектов.

Доклиническая визуализация играет ключевую роль в разработке молекулярно-таргетной терапии при создании новых лекарственных препаратов и определении безопасности и эффективности лекарственных препаратов. Одна из основных областей применения ОФЭКТ – проверка связывания меченых лекарственных веществ со специфическими мишенями с последующим определением их распределения в организме и фармакокинетики [9, 12–14]. Этот подход также информативен при проверке целевой доставки и специфичности новых терапевтических лекарственных препаратов или радиофармацевтических средств [15].

ОФЭКТ применяли для изучения связывания меченого йодобензамида радионуклидом [^{123}I] с D2-рецептором дофамина в мозге крысы после специфической терапии [16]. При изучении противоопухолевых липосом, меченых технецием $^{99\text{m}}$ показана их перспективность при противоопухолевой локальной терапии [17]. Конъюгаты сополимера гидроксиметаакриламида с D-аспарагиновой кислоты октапептида мечены [^{125}I] при изучении фармакокинетики и биораспределения после внутривенного введения мышам показали высокую эффективность при лечении экспериментального остеопороза и других болезней опорно-двигательного аппарата [18]. Мечение радиоизотопом [^{123}I] использовали в исследованиях по изучению фармакокинетики аналогов натрийуретического пептида предсердий. После внутривенного введения кроликам препаратов с удельной радиоактивностью 15 МБк/кг и проведения

сцинтиграфии всего тела с помощью гамма-камеры установили, что накопление и выделение препаратов осуществляется почками [19]. В работе по изучению распределения меченого [^{125}I] альфа-фетопротеина человека после его внутривенного введения мышам было установлено, что максимальное накопление альфа-фетопротеина в разных тканях и органах животных наблюдается, как правило, через 5 ч после введения. Затем этот белок постепенно выводится из организма. В печени, кишечнике и крови животных [^{125}I]-альфа-фетопротеин сохраняется в течение, по крайней мере, 3 суток [20].

Таким образом, анализ литературных данных показал, что применение ОФЭКТ для изучения фармакокинетики и распределения лекарственных веществ в органах и тканях является апробированным подходом при доклиническом изучении лекарственных веществ белковой природы.

Целью данной работы было изучение фармакокинетики, распределения и накопления в органах и тканях комплексного пептидно-белкового препарата Целлекс, меченого радиоизотопом [^{123}I], при однократном внутривенном введении лабораторным животным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил препарат Целлекс (с. 003010617, срок годности до 06.2019, производство АО «Фарм-Синтез», г. Москва, Россия).

Оборудование и методы

В работе использовали следующее оборудование: однофотонный эмиссионный компьютерный томограф E. Cam Var Angle (Siemens AG, Германия) и дозкалибратор ATOMLAB-100 (Biodex Medical Systems, Inc., США).

Получение меченого [^{123}I]-Целлекс

Йодирование проводили с использованием йодогена по протоколу Thermo Fisher Scientific. Нейтрализацию осуществляли радиоактивным йодом NaI^{123} в 0,01 М растворе NaOH (АО Радиевый институт им. В. Г. Хлопина, Санкт-Петербург). Не связавшийся йод и окислитель удаляли центрифугированием на микроколонках с сефадексом G-15. Радиохимическую чистоту меченого [^{123}I] Целлекса подтверждали методами тонкослойной хроматографии и электрофореза в полиакриламидном геле с SDS с последующим анализом радиоактивности фракций в сцинтилляционной камере.

Биологический эксперимент

Исследование проведено на 24 аутбредных самцах крыс, полученных из питомника лабораторных животных АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», в возрасте 13–

15 недель и массой к началу исследования 315–385 г. Лабораторные животные содержались в стандартных условиях вивария со световым режимом 12 часов света и 12 часов темноты на полнораціонной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных (по ГОСТ Р 50258-92). Эксперименты выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 53434-2009), согласованном с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» и одобрены на заседании биоэтической комиссии СПб «Института фармации».

¹²³I-Целлекс с активностью от 2,0 до 3,0 МБк вводили голодавшим в течение 8 часов животным однократно в хвостовую вену через флексию. Образцы органов крыс (мозг, легкие, печень, почки, тимус, поджелудочная железа, селезенка) отбирали после эвтаназии животных путем передозировки средства для наркоза с последующей цервикальной дислокацией через 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 4 и 6 часов после введения препарата. Тела животных и свежееотобранные образцы анализировали с использованием статической сцинтиграфии на двухпротекторном томографе E. Cam Var Angle и дозкалибраторе ATOMLAB-100.

Сцинтиграфия всего тела

С целью выявления основных «органов-мишеней» с наибольшим накоплением меченого препарата через 10–15 мин после его введения проводили запись диагностической информации при статическом исследовании методом полипозиционной гамма-сцинтиграфии на томографе в течение 600 секунд с получением планарных изображений, позиционируя детекторы томографа на $0 \pm 10^\circ$ (передняя проекция) и $180 \pm 10^\circ$ (задняя проекция). Использовали матрицу 64x64 пикселей, Zoom=2. На каждую проекцию набирали не менее 100 тыс. импульсов. При обработке полученных данных очерчивали «зоны интереса» над областями интереса всей матрицы изображения, головы, щитовидной железы, средостения (сердца), легкого, печени, почки, селезенки, мочевого пузыря и мягких тканей. На основании полученных данных по каждой зоне вычисляли коэффициенты в абсолютных единицах, отражающие накопление препарата в каждой из «зон интереса» по сравнению с общим счетом матрицы, соответствующим уровню накопления во всем организме животного.

Радиометрия органов и тканей

Свежееотобранные образцы органов и тканей изучали методом радиометрии с получением абсолютного счета в импульсах, в сравнении с результатами радиометрии шприца с препаратом, меченым ¹²³I, перед введением животному.

Радионуклиды, обладающие гамма-излучением, регистрировали по характерным для них линиям гамма-излучения.

Распределение препарата в органах рассчитывали как процент от введенной дозы препарата, меченого ¹²³I, на 1 г органа [21].

$$\% \text{ от введенного} = \frac{I_1}{I_0 \cdot m_1} \cdot 100, \quad (1)$$

где I_1 – абсолютное число импульсов, измеренное в органе; I_0 – общее число импульсов введенного препарата; m_1 – масса органа, г.

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007.

Для статистической оценки различий между концентрациями действующего вещества и фармакокинетическими параметрами был применен парный двухвыборочный t-тест для средних (оценку проводили при уровне достоверности 95%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди наиболее распространенных γ -радиоактивных изотопов прежде всего следует отметить изотопы йода (¹³³I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹²⁵I). В клинических исследованиях для терапии применяется ¹³¹I [3, 11], поскольку он характеризуется высокоэнергетической γ -эмиссией ($E_{\max} = 0,81$ мэВ) и относительно малым периодом полураспада (семь суток). Гамма-излучение ¹²³I обладает меньшей энергией; его период полураспада составляет 13 часов, вследствие чего он предпочтительнее для радиодиагностики, чем для терапии. Введение в молекулы белков и пептидов радиоизотопов йода (радиойодирование) может осуществляться прямым или непрямым способом. В первом случае объектом йодирования являются ароматические ядра аминокислот, в первую очередь тирозина. Источником частицы I⁺ является раствор йодида натрия, на который воздействуют различные окислители – хлорамин Т, пероксидаза, йодоген, электрический ток и другие. Во втором случае к N-концу исходного полипептида либо присоединяют специально приготовленный аминокислотный остаток, который затем легко йодируется, либо присоединяют заранее меченый фрагмент.

В качестве реактива выбора при йодировании выбрали йодоген, поскольку по сравнению с другими применяемыми для этих целей окислителями (например – с хлорамин Т) йодоген в наименьшей степени вызывает денатурацию белка. Кроме того, йодоген не растворим в воде, и, таким образом, в отличие от других окислителей, не попадает в образец и не тре-

бует дополнительных стадий очистки. Принцип метода заключается в том, что йодоген окисляет I до I⁺, который встраивается в ОН-группу в орто-положении тирозина.

Радиохимическую чистоту меченого ¹²³I Целлекса определяли методом тонкослойной радиохроматографии на пластинах Silica gel с использованием в качестве хроматографической системы смесь 50% водного этанола с ацетонитрилом в соотношении 2:1 с добавкой 0,1% радиоактивного NaI и электрофореза с последующим анализом радиоактивности с помощью сцинтилляционного сканирующего счетчика. Радиохимическая чистота полученного препарата ¹²³I-Целлекс составила не менее 98%.

Раствор ¹²³I-Целлекс для введения лабораторным животным имел следующие характеристики: pH 7,3; удельная радиоактивность 350 МБк в 1,1 мл; концентрация Целлекса 0,95–1,0 мг/мл; концентрация альбумина 0,2 мг/мл.

Распределение меченого препарата в органах и тканях

Изучение тканевой доступности лекарственных средств является важным этапом при проведении фармакокинетических исследований. Основным результатом процессов распределения является транспорт лекарственного средства в зону действия, где оно взаимодействует со структурами, определяющими эффект препарата.

В настоящем исследовании методом радиометрии было изучено распределение меченого препарата Целлекс в головном мозге, печени, почках, лег-

ких, селезенке, тимусе, мочевом пузыре и поджелудочной железе после однократного внутривенного введения.

Распределение препарата Целлекс, меченого ¹²³I, у нормальных здоровых крыс, визуализированное с использованием гамма-камеры, показано на рисунке 1.

Соответствующие значения радиоактивности были определены в «зонах интереса» в проекции (1) головы/головного мозга, (2) щитовидной железы, (3) легкого, (4) средостения/сердца, (5) селезенки, (6) печени, (7) почки, (8) мягких тканей/мышцы конечности и (9) мочевого пузыря.

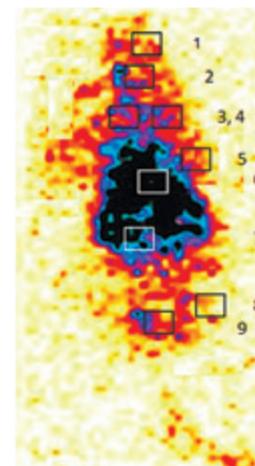


Рисунок 1. Распределение препарата Целлекс, меченого ¹²³I, в органах и тканях крыс через 15 мин после внутривенного введения в хвостовую вену

При проведении фармакокинетических исследований белков, меченных радиоактивной меткой, важно дифференцировать радиоактивность, источником которой является непосредственно меченый белок, и излучение свободных молекул радиоактивного йода, возникающих при распаде меченого белка. Поскольку свободные молекулы йода преимущественно накапливаются в щитовидной железе, тот факт, что в нашем исследовании активность препарата в этом органе составляла не более 2% от введенной дозы, свидетельствует о высокой стабильности меченого белка. Таким образом, полученные при измерении радиоак-

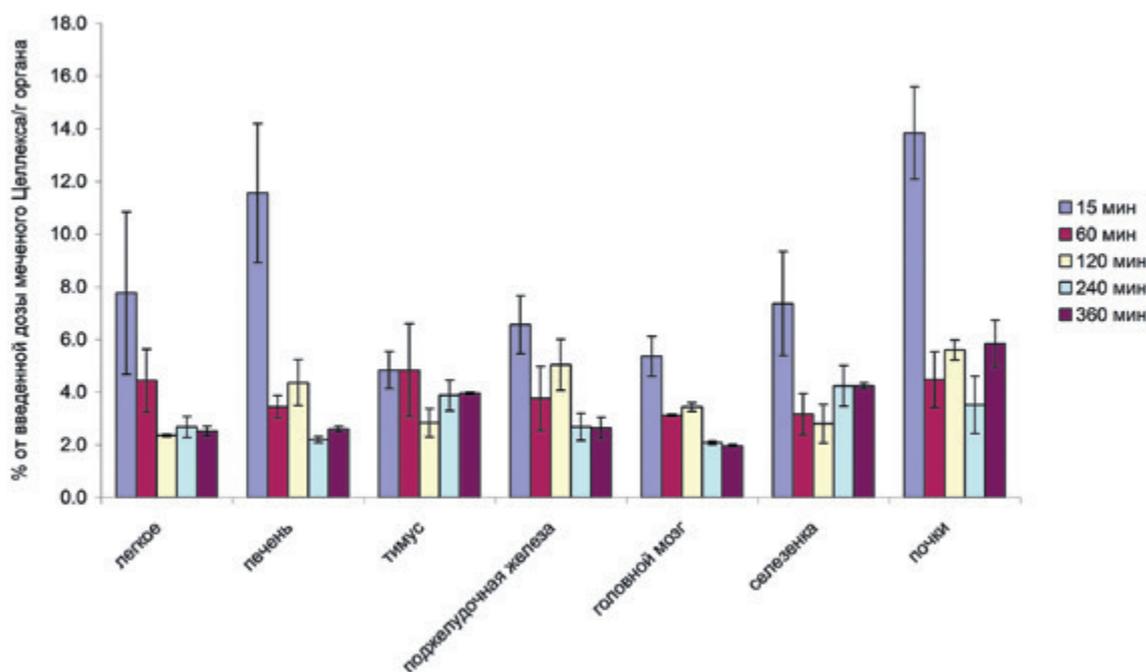


Рисунок 2. Распределение препарата Целлекс, меченого ¹²³I, в органах и тканях после внутривенного введения крысам

тивности данные говорят о распределении в тканях и органах именно препарата.

Картина распределения, наблюдаемая при скинтиграфическом исследовании соответствовала данным, полученным при инвазивной радиометрии после эвтаназии крыс в разные временные интервалы (рисунок 2).

Данные, представленные на рисунке 2, демонстрируют наибольшее накопление препарата в органах и тканях через 15 мин после его введения.

Максимальное накопление препарата наблюдалось в почках (14%), что составило около 25% от общего количества препарата, обнаруженного во всех органах через 15 минут после введения. В головном мозге было детектировано около 10% от общего количества препарата, обнаруженного во всех органах через 15 мин после введения (рисунок 2).

Таким образом, после введения исследуемого препарата наблюдается быстрое (в течение 15 мин) его поступление в органы и ткани. После введения препарата его наибольшее количество наблюдается в печени и почках. Затем происходит уменьшение содержания препарата в органах и тканях. Повторное увеличение содержания препарата в некоторых органах и тканях (печень, почки) через 360 мин свидетельствует о появлении в органах его метаболитов.

Радиоактивность в проекции почек и печени появилась вскоре после внутривенного введения препарата, меченого ^{123}I . Значительная активность мочи в мочевом пузыре, визуализированная при помощи гамма-камеры (рисунок 1), позволила предположить, что почки являются главным выделительным путем для препарата. Изучение распределения и скинтиграфическая оценка белково-пептидного комплекса Целлекс, меченого ^{123}I , также показало значительное присутствие в печени, легких и селезенке.

Установлено, что препарат проникает через гематоэнцефалический барьер и обнаруживается в головном мозге (рисунки 2, 3). Динамика изменения содержания препарата Целлекс, меченого ^{123}I , в головном мозге крыс после однократного введения имеет схожий характер с общей картиной поступления в другие органы и ткани и его последующего выведения (рисунок 3). Препарат быстро поступает в головной мозг. Фармакокинетическая кривая носит двухфазный характер, первый максимум содержания препарата в головном мозге наблюдается через 15 мин после введения и составляет 25 единиц абсолютных значений импульсов/г органа, второй максимум – через 2 ч и составляет около 15 единиц абсолютных значений импульсов/г органа. Далее наблюдается постепенное снижение содержания препарата, что свидетельствует о попадании в мозг вторичных метаболитов Целлекса.

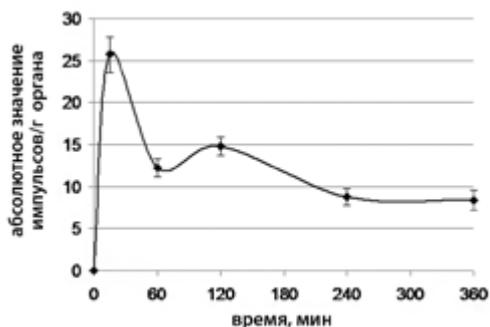


Рисунок 3. Кривая препарата Целлекс, меченого ^{123}I , в зависимости от времени в головном мозге при однократном внутривенном введении крысам ($n=3$, $\bar{X} \pm S\bar{X}$)

Таким образом, на основании скинтиграфического исследования основными органами-мишенями, представляющими «зоны интереса», максимально накапливающими препарат и, соответственно, представляющими клиническую значимость, были: головной мозг, печень, почки, селезенка, легкие, тимус и поджелудочная железа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые изучено распределение в органах и тканях комплексного белково-пептидного препарата Целлекс, меченого радиоизотопом ^{123}I .

После однократного внутривенного введения крысам препарата Целлекс, меченого ^{123}I , установлено, что кинетика препарата характеризуется быстрым поступлением в ткани и органы. Наибольшее содержание препарата во всех органах и тканях наблюдалось через 15 минут после его введения.

Максимальный процент накопления препарата наблюдается в почках – 14% от введенного препарата, что составляет около 25% от общего количества препарата, обнаруженного во всех органах через 15 минут после введения.

В головном мозге накапливается около 6% от введенного препарата, что составляет 10% от общего количества препарата, обнаруженного во всех органах через 15 минут после введения и указывает на его проникновение через ГЭБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пизова Н. В., Соколов М. А., Измайлов И. А. Целлекс в лечении больных с острым нарушением мозгового кровообращения: результаты российского многоцентрового сравнительного открытого клинического исследования // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2014. Т. 114. № 5. С. 22–26. [Pizova N. V., Sokolov M. A., Izmajlov I. A. Celleks v lechenii bol'nyh s ostrym narusheniem mozgovogo krovoobrashcheniya: rezul'taty rossijskogo mnogocentrovogo sravnitel'nogo otkrytogo klinicheskogo issledovaniya // Zhurnal nevrologii i psichiatrii im. S. S. Korsakova. [Cellex in the treatment of patients with acute cerebrovascular

- accident: the results of a Russian multicenter comparative open clinical study // *Journal of Neurology and Psychiatry*. S. Korsakov.] 2014. T. 114. № 5. P. 22–26.]
2. Кулеш А. А., Шестаков В. В. Постинсультные когнитивные нарушения и возможности терапии препаратом целлекс // *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2016. Т. 116. № 5. С. 38–42. [Kulesh A. A., Shestakov V. V. Postinsul'tnyye kognitivnye narusheniya i vozmozhnosti terapii preparatom celleks // *Zhurnal nevrologii i psihiatrii im. S. S. Korsakova*. [Post-stroke cognitive impairment and the possibility of treatment with Cellex // *Journal of Neurology and Psychiatry*. S. S. Korsakov.] 2016. T. 116. № 5. P. 38–42.]
 3. Регистр Лекарственных Средств России РЛС. [Regist Lekarstvennyh Sredstv Rossii RLS.] [Register of Medicinal Products of Russia Radar.] Available at: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_49945.htm (accessed 26.01.2018).
 4. Федеральный закон 361-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010. [Federal'nyy zakon 361-FZ «Ob obrashchenii lekarstvennyh sredstv» ot 12.04.2010.] [Federal Law 361-FZ "On Circulation of Medicines" dated April 12, 2010.] Available at: <https://rg.ru/2010/04/14/lekarstva-dok.html> (accessed 26.01.2018).
 5. Kuil J., Velders A. H., Van Leeuwen F. W. B. Multimodal tumor-targeting peptides functionalized with both a radio- and a fluorescent-label // *Bioconjugate Chem.* 2010. V. 21. P. 1709–1719.
 6. Kuil J., Buckle T., Oldenburg J., Yuan H., Borowsky A. D., Josephson L., Van Leeuwen F. W. Hybrid peptide dendrimers for imaging of chemokine receptor 4 (CXCR4) expression // *Molecular pharmaceutics*. 2011. V. 8. P. 2444–2453.
 7. Кучмий А. А., Ефимов Г. А., Недоспасов С. А. Методы молекулярной визуализации *in vivo* // *Биохимия*. 2012. Т. 77. С. 1603–1620. [Kuchmij A. A., Efimov G. A., Nedospasov S. A. Metody molekulyarnoy vizualizatsii *in vivo* // *Biohimiya*. [Metody molekulyarnoy vizualizatsii *in vivo* // *Biohimiya*.] 2012. T. 77. S. 1603–1620.]
 8. Гранов А. М., Тютин Л. А., Станжевский А. А., Костеников Н. А., Панфиленко А. Ф. Разработка и внедрение в клиническую практику новых туморотропных радиофармпрепаратов – важнейший аспект использования достижений ядерной медицины в онкологической клинике // *Лучевая диагностика и терапия*. 2012. № 4. С. 11–21. [Granov A. M., Tyutin L. A., Stanzhevskij A. A., Kostenikov N. A., Panfilenko A. F. Razrabotka i vnedrenie v klinicheskuyu praktiku novyh tumorotropnyh radiofarmpreparatov – vazhnejshij aspekt ispol'zovaniya dostizhenij yadernoj mediciny v onkologicheskoy klinike // *Luchevaya diagnostika i terapiya*. [The development and introduction of new tumor-tropic radiopharmaceuticals into clinical practice is the most important aspect of using the achievements of nuclear medicine in the oncological clinic. *Radiology and Treatment*.] 2012. № 4. С. 11–21.]
 9. Meikle S. R., Kench P., Kassiou M., Banati R. B. Small animal SPECT and its place in the matrix of molecular imaging technologies // *Physics in medicine and biology*. 2005. V. 50(22). P. R45–R61.
 10. Khalil M. M., Tremoleda J. L., Bayomy T. B., Gsell W. Molecular SPECT Imaging: An Overview // *International journal of molecular imaging*. 2011. V. 2011. P. 15.
 11. Van der Have F., Vastenhout B., Ramakers R. M., Branderhorst W., Kraaij J. O., Ji C., Staelens S. G., Beekman F. J. U-SPECT-II: An ultra-high-resolution device for molecular small-animal imaging // *Journal of Nuclear Medicine*. 2009. V. 50(4). P. 599–605.
 12. Burvenich I. J., Schoonooghe S., Blanckaert P., Bacher K., Vervoort L., Coene E., Mertens N., De Vos F., Slegers G. Biodistribution and planar gamma camera imaging of (123)I- and (131)I-labeled F(ab')₂ and Fab fragments of monoclonal antibody 14C5 in nude mice bearing an A549 lung tumor // *Journal of Nuclear Medicine*. 2007. V. 34. T. 3. P. 257–265.
 13. Merkel O. M., Librizzi D., Pfestroff A., Schurrat T., Béhé M., Kissel T. *In vivo* SPECT and real-time gamma camera imaging of biodistribution and pharmacokinetics of siRNA delivery using an optimized radiolabeling and purification procedure // *Bioconjugate chemistry*. 2009. V. 20(1). P. 174–182.
 14. Williams S. P. Tissue distribution studies of protein therapeutics using molecular probes: molecular imaging // *AAPS J.* 2012. V. 14. T. 3. P. 389–399.
 15. Refai E., Jonsson C., Andersson M., Jacobsson H., Larsson S., Kogner P., Hassan M. Biodistribution of liposomal 131I-VIP in rat using gamma camera // *Nuclear medicine and biology*. 1999. V. 26(8). P. 931–936.
 16. Nikolaus S., Larisch R., Wirrwar A., Jamdjeu-Nouné M., Antke C., Beu M., Müller H. W. [123I]Iodobenzamide binding to the rat dopamine D receptor in competition with haloperidol and endogenous dopamine – an *in vivo* imaging study with a dedicated small animal SPECT // *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2005. V. 32 (11). P. 1305–1310.
 17. Bao A., Phillips W.T., Goins B. et al. Potential use of drug carried-liposomes for cancer therapy via direct intratumoral injection // *International Journal of Pharmaceutics*. 2006. V. 316(1-2). P. 162–169.
 18. Wang D., Sima M., Mosley R. L., Davda J. P., Tietze N., Miller S. C., Kopeček J. Pharmacokinetic and biodistribution studies of a bone-targeting drug delivery system based on N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide Copolymers // *Molecular Pharmaceutics*. V. 3(6). P. 717–725.
 19. Wolf H., Marschall F., Scheffold N., Clausen M., Schramm M., Henze E. Iodine-123 labelling of atrial natriuretic peptide and its analogues: initial results // *European journal of nuclear medicine*. 1993. V. 20(4). P. 297–301.
 20. Северин С. Е., Кулаков В. Н., Москалева Е. Ю., Северин Е. С., Слободяник И. И., Климова Т. П. Распределение меченного йодом-125 альфа-фетопротейна в организме животных и его накопление в ткани опухоли // *Вестник РАМН*. 2012. № 4. С. 11–15. [Severin S. E., Kulakov V. N., Moskaleva E. YU., Severin E. S., Slobodyanik I. I., Klimova T. P. Raspreделение mechenного jodom-125 al'fa-fetoproteina v organizme zhivotnyh i ego nakoplenie v tkani opuholi // *Vestnik RAMN*. [Distribution of iodine-labeled-125 alpha-fetoprotein in the organism of animals and its accumulation in the tumor tissue // *Herald of the Russian Academy of Medical Sciences*.] 2012. № 4. С. 11–15.]
 21. Bayrak E., Lambrecht F. Y., Durkan K., Yilmaz O. *In vitro* evaluation, biodistribution in rats of radiolabeled raloxifene // *Applied radiation and isotopes*. 2010. V. 68(1). P. 33–36.

УДК 615.12

ОПЫТ ВНЕДРЕНИЯ СИСТЕМЫ LIMS В БИОАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР (ЧАСТЬ 1)

А. А. Крылатова^{1*}, И. Е. Шохин¹, А. С. Кардашин²

Резюме. Центр Фармацевтической Аналитики приобрел и установил лабораторную информационную систему LabWare LIMS, электронные лабораторные журналы LabWare ELN компании LabWare. В данный момент проходит первый этап интеграции системы в работу лаборатории, создание шаблонов для проведения научно-исследовательских работ (НИР) и обучение сотрудников. Компания LabWare получила всеобщее признание, является лидером на мировом рынке глобальных Лабораторных информационных систем (ЛИМС) и имеет широкий круг лояльных пользователей. Статья открывает цикл статей по интеграции системы LIMS в работу аналитического центра.

Ключевые слова: LIMS, ELN, LabWare, обеспечение качества.

AN EXPERIENCE OF IMPLEMENTING LIMS SYSTEM IN THE BIOANALYTICAL LABORATORY (PART 1)

A. A. Krylatova^{1*}, I. E. Shohin¹, A. S. Kardashin²

Abstract. Center of Pharmaceutical Analytics purchased and installed LabWare LIMS laboratory information system, LabWare ELN electronic laboratory journals from LabWare company. At the moment, the system is integrating into the work of the laboratory, templates for research work are created and employees are trained. The article opens a series of articles of the integration of the LIMS system into the work of the analytical center. LabWare has received universal recognition, is a leader in the global market of global Laboratory information systems (LIMS) and has a wide range of loyal users.

Keywords: LIMS, ELN, LabWare, quality assurance.

1 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», 117246, Россия, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

2 – ООО «ЛАБВЭА», 115093, Россия, Москва, ул. Люсиновская, д. 36, стр. 1

1 – LLC CPHA, 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

2 – LLC Labware, 36/1, Lusinovskaya str., Moscow, 113093, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: a.krylatova@cpha.ru

ВВЕДЕНИЕ

В условиях современного мира и высокой конкуренции между испытательными центрами одним из решающих факторов при выборе лаборатории служит обеспечение качества проведения исследования. Для этого все этапы проведения исследования – от приёма и регистрации исследуемых образцов до представления заключительного отчёта заказчику, состояние используемого оборудования, качество реактивов и условия окружающей среды должны подвергаться постоянному независимому контролю. Выполнение научно-исследовательских работ в организации требует регулярного заполнения химиками-аналитиками первичной документации и постоянного мониторинга процесса со стороны отдела обеспечения качества и руководителя исследования. Для оптимизации работы в лаборатории, сокращения времени заполнения первичной документации, систематизации данных

и их хранения нами были приобретена лабораторная платформа LabWare ELP, объединяющая программные продукты LIMS, ELN компании LabWare.



О КОМПАНИЯХ

ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») – сертифицированный по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014), ГОСТ Р ИСО 9001:2015 и ISO 9001:2015 лабораторный центр, выполняющий высококачественные исследования в области разработки и контроля инновационных и воспроизведенных лекарственных средств. Основными видами деятельности центра являются: биоаналитические исследования (аналитический этап исследований биоэквивалентности, доклинических исследований и 1 фазы

клинических исследований) химико-фармацевтических лекарственных средств, нанопрепаратов и препаратов-биоаналогов; сравнительный тест кинетики растворения (моделирование высвобождения лекарственных средств в желудочно-кишечном тракте в условиях *in vitro*); статистическая обработка результатов биоаналитических исследований и описание фармакокинетики препаратов; разработка, валидация и апробация методик анализа лекарственных средств.

Компания LabWare получила всеобщее признание и является мировым лидером в предоставлении решений по автоматизации лабораторий. Разработанная платформа LabWare включает в себя LabWare LIMS (Лабораторная информационная менеджмент система) и LabWare ELN (Электронный лабораторный журнал). Цель компании – предоставить решение, позволяющее отстроить и оптимизировать систему качества лаборатории, которая основывается на получении достоверной информации по результатам испытаний и ее оптимизации с целью принятия своевременных управленческих решений на всех этапах проведения работ.



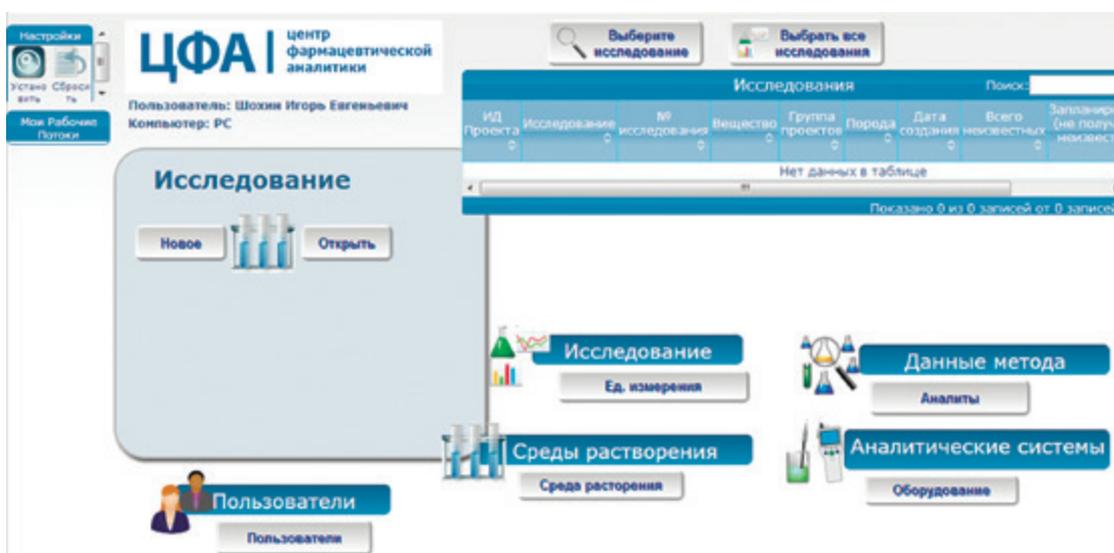
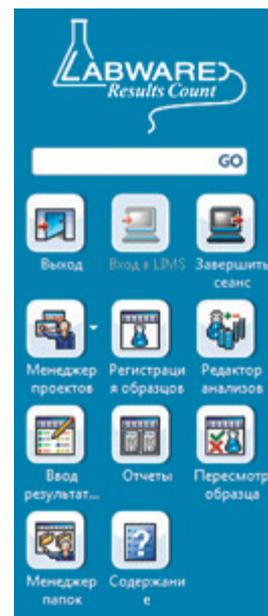
ИНТЕГРАЦИЯ СИСТЕМЫ

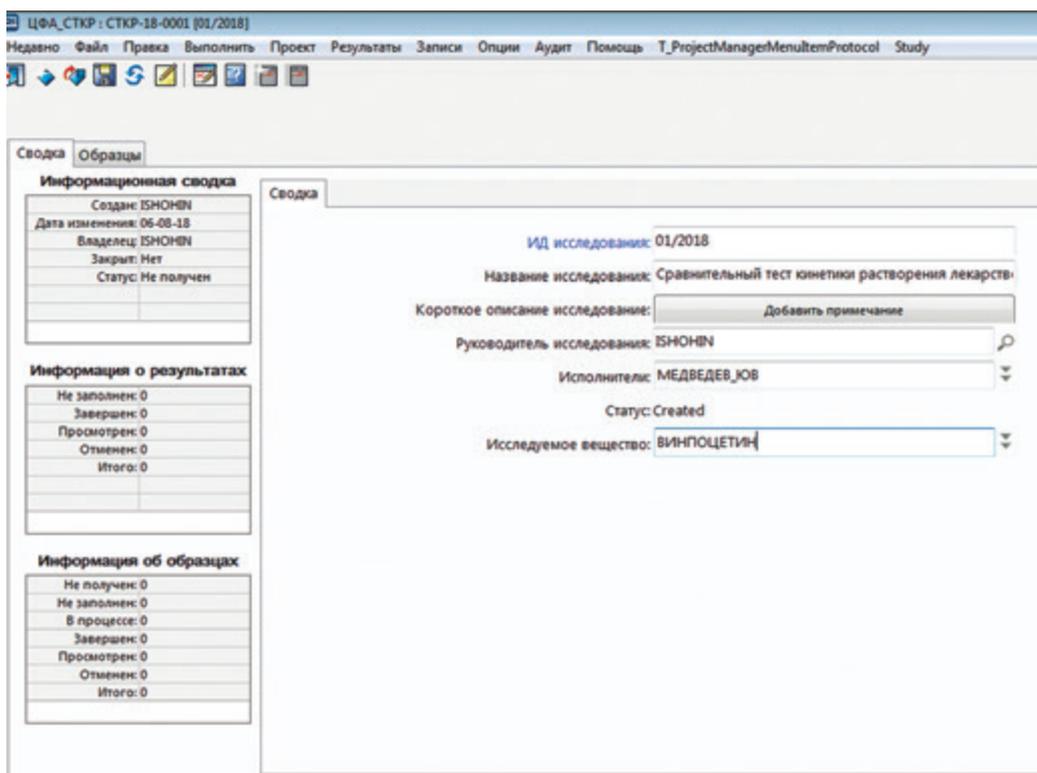
Типовые процессы лаборатории можно разделить на две сферы деятельности. Одна из них касается аспектов функционирования лаборатории, включая полный жизненный цикл образца, управление ресурсами, мониторинг качества измерений и хранение накопленных со временем данных. Данная сфера

деятельности классифицируется как Лабораторная информационная менеджмент система (LIMS). Другая сфера связана с научно-исследовательской деятельностью, которая позволяет проводить эксперименты и вести записи структурированных и неструктурированных данных, а также осуществлять контроль выполнения испытаний. Данный вид деятельности может быть автоматизирован при помощи Электронного лабораторного журнала (ELN).

Для обеспечения эффективности поиска информации об исследовании в системе LIMS была создана база поступающих в лабораторию образцов, в которой регистрируются дата и время поступления образца, анализируемое вещество, индивидуальный номер исследования, описание внешнего вида и количества образцов. Также были созданы базы сред растворов, оборудования и валидированных биоаналитических методик. Система LIMS позволяет получать доступ к данным по текущему исследованию для ведения Электронного лабораторного журнала (ELN).

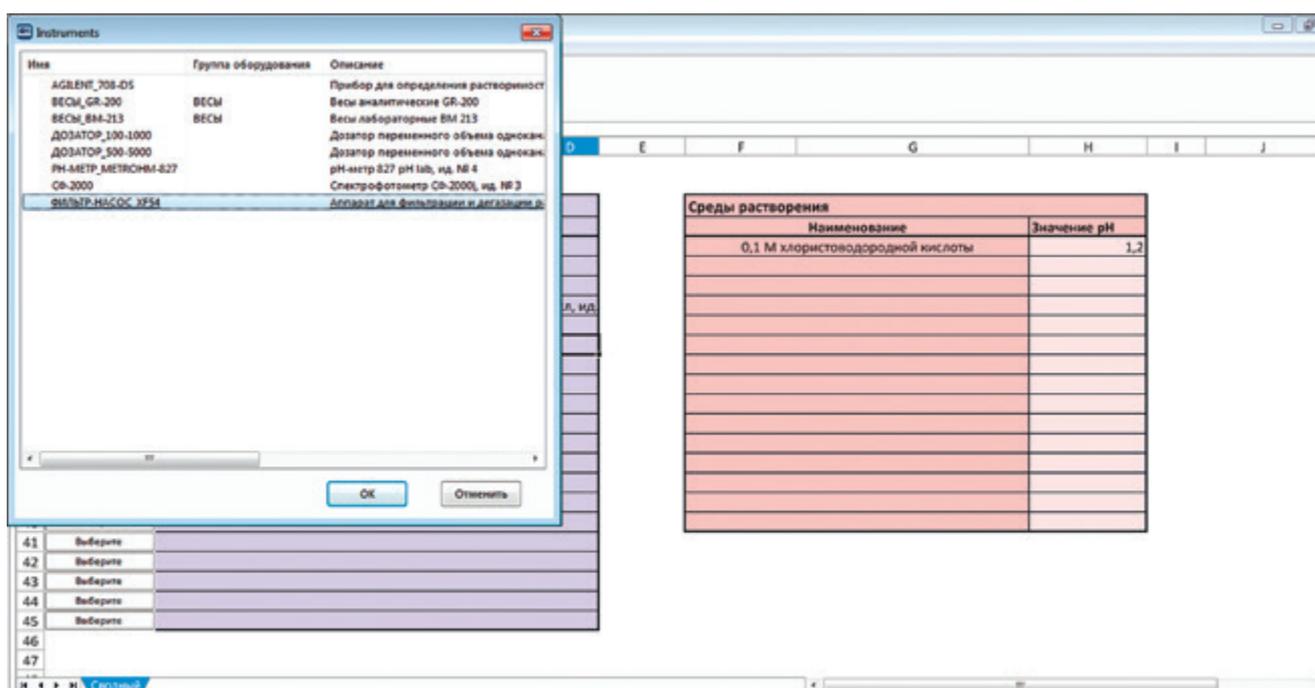
На данном этапе в приобретенной системе разработан электронный лабораторный журнал для выполнения НИР по сравнительному тесту кинетики растворения исследуемых препаратов. Форма позволяет сотруднику лаборатории пошагово выполнять этапы работы, опираясь на план исследования. Пользовательский интерфейс LabWare ELN состоит из различных модулей. На рабочем столе аналитик мо-





жет видеть блоки информации, представляющие собой оборудование лаборатории, методики приготовления сред растворения, список исследований, анализируемые вещества. Информацию о новом исследовании вводит администратор, присваивает ему номер, прикрепляет утвержденный план исследования, включает сотрудников, ответственных за проведение работ. Доступ к первичным документам исследования имеют сотрудники, утвержденные в плане исследования.

После выбора номера исследования авторизованный сотрудник может вводить информацию, такую как: числовые данные и текстовые комментарии, включая расширенную возможность записи данных при помощи встроенного текстового редактора; прикреплять файлы или изображения, создавать графики, производить вычисления. Записи ведутся в «on-line» режиме, параллельно выполнению работ по исследованию. Любую первичную запись можно идентифицировать по автоматически выставляемой



ЦФА, СТКР: ЦФА, СТКР-18-00001 - [ИШОНФВ] Шохин Игорь Евгеньевич (Analyte activated)

Медленно Файл Правка Выполнить Данные Образцы СОП Аудит СТКР

Указать причину аудита
Посмотреть историю аудита
Посмотреть историю Рабочей тетради
Посмотреть историю данных
Посмотреть историю Рабочей тетради и Текстовых примечаний

Исследуемые препараты:			
	Наименование	Серия	Код
12	Выберите ЛС	Винпоцетин, таблетки 5 мг	010817
13	Выберите ЛС	Винпоцетин, таблетки 5 мг	020817
14	Выберите ЛС		
15	Выберите ЛС		
16	Выберите ЛС		
17	Выберите ЛС		
18	Выберите ЛС		
19	Выберите ЛС		
20	Выберите ЛС		
21	Выберите ЛС		

Используемое оборудование:			
	Наименование		
26	Выберите	Прибор для определения растворимости 708-05	
27	Выберите	Весы аналитические GR-200	
28	Выберите	Весы лабораторные BM 213	
29	Выберите	ор переменного объема одноканальный «Техно» 100 – 1000 мл, ид.	
30	Выберите	ор переменного объема одноканальный «Техно» 500 – 5000 мл, ид.	
31	Выберите	pH-метр 827 pH lab, ид. № 4	
32	Выберите	Спектрофотометр СФ-2000J, ид. № 3	
33	Выберите	сорос Millirog, вакуумный насос для фильтрации и дегазации жидко	

Референтные препараты:			
	Наименование	Серия	Код
Выберите ЛС	Винпоцетин, таблетки 5 мг	150916	R
Выберите ЛС			

Среды растворения	
Наименование	Значение pH
0,1 М хлористоводородной кислоты	1,2
0,1 М хлористоводородной кислоты	3,2
ацетатный буферный раствор	4,5
фосфатный буферный раствор	6,8

дате и подписи сотрудника, который ввел необходимую информацию.

Также в ELN предусмотрена возможность сбора данных с лабораторных приборов, которые используют собственное программное обеспечение (Waters Empower, Agilent OpenLab и др.), данные из сформированных отчетов обрабатываются, передаются в систему ELN и включаются в заключительный отчет исследования.

Система позволяет в режиме аудита данных проводить проверку записей отделом обеспечения качества, руководителем исследования, не прерывая работу химиков-аналитиков. В любой момент проведения исследования спонсор может убедиться в правильности выполнения действий аналитиков, проверить наличие первичных данных и удостоверится в соблюдении требуемых условий выполнения анализа. Всю запрашиваемую информацию можно распечатать и передать заказчику, а также показать в лаборатории в режиме аудита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Программное решение LabWare LIMS обеспечивает повышение производительности и качественных показателей, а также снижение общих рисков и затрат на проведение НИР. Использование электронного лабораторного журнала позволяет сократить время заполнения первичной документации, провести идентификацию данных, создавать шаблоны методов анализа, осуществлять быстрый поиск в системе необходимых методик и данных, а резервное копирование на установленном сервере обеспечивает сохранность первичных данных. В итоге система представляет со-

бой уникальное сочетание автоматизации исследований и процедур управления, что делает ее идеальным решением как для проведения исследований, так и для обеспечения качества.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крылатова А. А., Шохин И. Е., Образцова Е. П., Монаенков А. О. Опыт сертификации биоаналитической лаборатории согласно ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. №4(17). С. 218–221.
2. LabWare ELP – Лабораторная платформа предприятия. Available at: https://www.labware.ru/images/brochure/LW_ELP.pdf/ (accessed 23.10.2018).

УДК 615.12

РОЛЬ ОБЗОРА НАУЧНЫХ РАБОТ В РЕГИСТРАЦИИ ВОСПРОИЗВЕДЕННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И ЗОНЕ ЕАЭС

К. С. Мильчаков^{1*}

Резюме. Введение. Обзор доклинических и клинических исследований – обязательный элемент общего технического документа, нового формата регистрационного досье лекарственного средства для Российской Федерации, а также региона Евразийского экономического союза. Разработка обзора научных данных требует специальных компетенций от составителя по поиску, оценке и систематизации информации. **Цель** статьи в описании последних законодательных требований, предъявляемых к обзору научных работ для воспроизведенного лекарственного средства от национального регулятора и Евразийской экономической комиссии, на основании опубликованных нормативно-правовых актов и регуляторного опыта НМА Литобзор. **Заключение.** Обзор научных работ в современном типе регистрационного досье один из ключевых элементов документации по воспроизведенному лекарственному препарату, в определенных случаях обзор заменяет собственные результаты исследований Заявителя. Подготовка обзоров требует большого опыта использования международных библиографических баз данных, знаний в области критической оценки научных исследований и хорошего уровня академического письма, а также осведомленности в области актуального национального законодательства и документов ЕАЭС.

Ключевые слова: регистрационное досье, воспроизведенный лекарственный препарат, дженерик, обзор доклинических исследований, обзор клинических исследований.

Об авторе: К. С. Мильчаков – Кандидат медицинских наук, научный директор НМА «Литобзор»; доцент высшей школы управления здравоохранением ПМГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский университет); ORCID: 0000-0003-4092-2539; ResearcherID: P-8234-2018.

THE ROLE OF THE SCIENTIFIC OVERVIEWS IN THE GENERIC DRUG REGISTRATION PROCESS IN THE RUSSIAN FEDERATION AND EURASIAN ECONOMIC UNION

K. S. Milchakov^{1*}

Abstract. Background: Non-clinical and clinical overviews are an obligatory part of the Common Technical Document, that is the new format of the registration dossier in the Russian Federation and Eurasian Economic Union. Development of the overview demands on specific skills of the literature search and critical appraisal and also of systematization of scientific data. **Goal** of the paper consists of the description of the latest legislative rules about the development of the reviews for generic drug application by Russian national and EAEU rules and also practical experience of SMA LitReview. **Conclusions:** The review is one of the key elements of the generic drug dossier now in the Russian Federation and EAEU. In some cases, the review can replace the results of own trials of the Sponsor. Review process demands skills of the use of the international bibliographic databases, critical appraisal, good academic writing skills and also knowledge of modern Russian and EAEU law.

Keywords: registrational dossier, generic drug, non-clinical overview, clinical overview.

Information about author: K. S. Milchakov – Candidate of Medical Sciences, Scientific Director of SMA; Associate Professor Higher School of Health Management I. M. Sechenov (Sechenov University); ORCID: 0000-0003-4092-2539; ResearcherID: P-8234-2018.

¹ – Медицинская научная организация «Литобзор», 119261, Россия, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 3, к. 2, оф. 25

¹ – Scientific medical journal organization «Litobzor», off. 25, 3/2, Lomonosovsky avenue, Moscow, 119261, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: info@lit-review.ru
Тел.: 8 (495) 646 49 75

ОБЗОР НАУЧНЫХ РАБОТ И УПРОЩЕННЫЙ ПРОЦЕСС РЕГИСТРАЦИИ ВОСПРОИЗВЕДЕННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

Обзор научных работ, давно существует как классическая часть большинства научно-исследовательских работ, задача которой состоит в отражении ак-

туальности исследуемой научной проблемы, основных исторических вех развития, описании существующих решений, поиска controversий и описания различных точек зрения. Однако, обзор литературы может быть и самостоятельным научным трудом в формате обзорных аналитических статей, экспертных мнений, систематических обзоров литературы и мета-анализов.

Обзор научных работ может принимать две основные формы: так называемые описательного или

качественного обзора литературы (он же аналитический обзор литературы), так и количественного обзора в виде систематического обзора и мета-анализа [1]. Ключевые компетенции, которые стоят в основе аналитического обзора литературы – профессиональный исчерпывающий библиографический мультиязыковой поиск научной литературы, оценка методологического качества найденных научных работ, реферирование, поиск контroversий, систематизация и анализ, синтез своих собственных выводов по проблеме, демонстрация высокого уровня навыков академического письма. Второй тип обзоров (количественный) требует навыков поиска сопоставимых дизайнов научных исследований с целью создания обобщенного математического вывода на основании первичных данных из статей [2].

Большое внимание к обзору научных работ, как к самостоятельному элементу регистрационного досье появилось у фармацевтического рынка относительно недавно, с момента вступления поправок в Федеральный Закон № 61 от 12.04.2010 г. [3] (введена Федеральным законом от 22.12.2014 № 429-ФЗ[4]), когда стало возможно использование обзора научных работ в качестве самостоятельного наполнения регистрационного досье без предоставления **собственных результатов доклинических и (или) клинических исследований для воспроизведенных лекарственных препаратов, в случае, если референтный препарат находится на рынке Российской Федерации более 20 лет.** В первую очередь такая возможность регистрации затронула лекарственные средства, для которых вовсе не было дополнительных исследований биоэквивалентности, это лекарственные препараты в форме для парентерального введения, водные растворы, растворы для перорального введения, ЛП, произведенные в форме лиофилизатов для приготовления растворов, газов, ушными или глазными ЛП, ЛП, предназначенных для приготовления растворов для местного применения, или для использования в форме небулайзера и спреев.

Стоит отметить, что формат и специфика обзора научных работ по доклиническим и клиническим исследованиям лекарственных средств диктуется видением национального регулятора, сложившейся из научной традиции советской научной школы и преимуществом подходов ИСН, которые во многом находят отражение в согласованных документах ЕАЭС.

Форматы текстов, источники для поиска научной литературы и наиболее важные проблемы подготовки обзорных модулей будут изложены в данной статье.

ЗАДАЧИ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ В РЕГИСТРАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Как было указано ранее, обзор научных работ в классическом варианте (например, для диссертации [5] или классической структуры НИР [6]), ставит несколько важнейших задач в зависимости от наличия научной новизны в научно-исследовательской работе (подчеркнуть актуальность, изложить основные вехи в развитии научной проблемы, найти противоречия, указать внимание читателя на неизученные области, найти и критически оценить аналоги и прототипы решения проблемы).

Однако в отношении обзора научных работ для государственной регистрации лекарственных средств такой подход не является оправданным, так как по сути, обзор не имеет дела с научной новизной и цель текста иная.

Ключевые задачи, которые выполняет обзор изложены в документации по структуре Общего Технического Документа п.6 специальных требований (II) Решения Совета Евразийской экономической комиссии № 78 от 03.11.2016 г.: в обзоре доклинических и клинических данных должны быть указаны:

- резюме профиля примесей активного вещества (и в соответствующих случаях – возможные продукты разложения, образующиеся при хранении лекарственного препарата) в сериях лекарственного препарата, который подлежит реализации на фармацевтическом рынке;
- оценка исследований биоэквивалентности или объяснение причины, по которой исследования биоэквивалентности не проводились;
- обновление литературных публикаций об активном веществе данного лекарственного препарата (данное требование может выполняться посредством указания ссылок на публикации в рецензируемых журналах);
- ранее неизвестные или следующие из характеристик препарата и (или) его терапевтической группы пункты в общей характеристике лекарственного препарата, которые следует проанализировать в доклинических и клинических обзорах (резюме) и подкрепить доказательствами из научной литературы и (или) доказательствами, полученными в результате проведения дополнительных исследований;
- дополнительная информация, доказывающая, что профили безопасности и (или) эффективности заявленного препарата не отличаются от таковых у референтного препарата в случае различия химических форм активного вещества (солей, эфиров,

изомеров, смеси изомеров, комплексов или производных от активного вещества референтного препарата) [7].

Как видно из формулировок закона, обзор научных работ по своим подходам должен использовать принципы составления отчетов по оценке медицинских технологий [8] (OMT, health technology assessment report), нежели методологию научного обзора. Однако, соблюдения жесткой методологии составления отчетов по OMT на данный момент не требуется.

ЮРИСДИКЦИИ ПОДАЧИ РЕГИСТРАЦИОННОГО ДОСЬЕ И ОСОБЕННОСТИ ФОРМАТА ДОСЬЕ

Геополитические изменения в виде формирования единых принципов обращения лекарственных средств в ЕАЭС (с 2014 года) привели к тому что помимо национального рынка фармацевтического государства появился надгосударственный рынок Союза. Для подачи регистрационного досье сразу для всего региона ЕАЭС необходим был унифицированный формат досье, единый для всех государств-членов Союза, им стал адаптированный перевод документов ICH CTD, а именно: Общий Технический Документ (eng. Common technical document). Этот же формат стал обязательным для подачи досье в по ФЗ №61 в Российской Федерации (п. 3 ст. 18 ФЗ № 6 от 21 апреля 2010 г.).

Таким образом, в случае подготовки обзоров научных данных о доклинических и клинических исследованиях лекарственного средства в формате Общего технического документа клиент подает документы не только по ФЗ№61, но по Решениям № 78 [7] и № 79 [9] Комиссии ЕАЭС. При этом до 31 декабря 2020 г. по выбору Заявитель может осуществлять регистрацию лекарственных средств, как по требованиям ЕАЭС, так и в соответствии с национальными требованиями государства-члена. При национальной регистрации страной обращения становится только та страна, которая выдала регистрационное удостоверение.

Альтернативным вариантом является регистрация лекарственного средства сразу по правилам Союза, причем, те Заявители, которые использовали национальный формат подачи должны осуществить перерегистрацию до 2025 года в соответствии с правилами ЕАЭС.

Описывая сложившуюся практику НМА Литобзор по подготовке и подаче обзоров научных работ, стоит разделить портфель кейсов на две типовые ситуации в зависимости от целей Спонсора: регистрация, к примеру, в Российской Федерации или ЕАЭС. Этот выбор диктует дальнейшие шаги по подбору нормативно-правовой базы для успешной подготовки обзоров научных работ.

У национального российского регулятора нет жестких указаний о составе обзора научных работ и достаточном количестве научных работ для государственной регистрации, в федеральном законе № 61 указано лишь использование обзоров вместо результатов собственных исследований Заявителя (п.п. 9 и 10 ст. 18 ФЗ № 61), таким образом, обзор доклинических данных должен дублировать структуру отчета о результатах доклинических исследований, и аналогично для обзора клинических исследований.

Так как общий вектор движения направлен на гармонизацию подходов регистрации с международными документами ICH, то неудивительно, что документах ЕАЭС есть ужесточение по экспертизе и детализации необходимых документов, в том числе обзоров научных данных. Так, появилось деление препаратов на отдельные классы: отличные от привычной дихотомии оригинальные и воспроизведенные препараты, выделены новые ранее неизвестные классы ЛП, такие как гибридные и неполные дженерики, также категория «grandma-drugs». К категории «бабушкиных лекарств» относятся препараты с хорошо изученным применением – эффективность и безопасность молекулы признаны на основе пострегистрационных и эпидемиологических исследований опыт обращения составляет более 10 лет не менее чем в 3 государствах. Сразу стоит отметить, что такое определение отличается от вышеуказанного пункта о 20 годах обращения в Российской Федерации, по процедуре ЕАЭС поэтому стоит уточнить юрисдикции обращения референтов [10].

ОБЗОР ДОКЛИНИЧЕСКИХ ДАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

Хотелось бы обратить внимание читателя на большую сложность у заявителей при разработке модуля по обзору научных работ доклинических исследований лекарственных средств. Такая ситуация может быть вызвана превалированием в коллективах по регистрации специалистов с высшим фармацевтическим образованием или специалистов «лечебное дело», для которых в данном контексте поиск, сбор и методологическая оценка литературных данных по доклиническим исследованиям может оказаться достаточно сложной задачей.

Формат представления обзора научных работ в виде отчета по доклиническим исследованиям по логике ФЗ № 61 представляет собой модуль 4 «Отчет о доклинических исследованиях». В формате общего технического документа обзор доклинических данных заложен в: модуле 2.4. (обзор доклинических исследований или non-clinical overview). По логике экспертов ЕАЭС обзор, как результат поиска и анализа мировых научных данных, должен быть изложен именно в разделе 2.4. Модуль 2.6 должен включать результаты собственных доклинических исследований Заявителя, ес-

ли они имели место быть, например, для тех дженериков, которые были зарегистрированы в переходные 2007–2014 г., и для которых повторно проводились исследования токсикологии, в противном случае указывается «не применимо к данному типу заявления на регистрацию».

Особое внимание разработчика модуля стоит обратить на процесс подготовки раздела по токсикологии, а именно исследованию острой, подострой и хронической токсичности и местнораздражающему (если применимо) действию лекарственного препарата [11]. В отличие от проблем отбора проведенных клинических исследований по ЛП, которые будут описаны далее, основной задачей составителя при работе с ДКИ обзором является подбор минимально достаточного количества исследований для соблюдения самого формата модуля, так как, как правило, доклинические исследования лекарственных препаратов не попадают в центральную печать и их трудно обнаружить. Именно технология работы с научными данными, в том числе серой литературой, фрагментами доклинических исследований *in vitro*, *in vivo*, скрупулезный скрининг списков библиографии, а также грамотный выбор препаратов-референтов являются ключевыми действиями при проработке модуля обзора доклинических данных лекарственных средств.

Примерный план обзора доклинических данных может быть следующим (модуль 2.4 ОТД):

2.4.1 Обзор стратегии доклинического изучения	2.4.4.2 Токсичность многократных доз
2.4.2 Фармакология	2.4.4.3. Генотоксичность
2.4.2.1 Общие свойства	2.4.4.4 Канцерогенность
2.4.2.2 Фармакодинамический механизм действия	2.4.4.5 Токсическое воздействие на репродуктивную функцию и внутриутробное развитие
2.4.2.3 Первичная фармакодинамика	2.4.4.6 Местная переносимость
2.4.2.4 Вторичная фармакодинамика	2.4.4.7 Прочие исследования токсичности
2.4.2.5 Фармакодинамические лекарственные взаимодействия	2.4.4.8 Экоотоксичность
2.4.3 Фармакокинетика	2.4.4.9 Токсикология отдельных компонентов лекарственной формы
2.4.3.1 Фармакокинетические лекарственные взаимодействия	2.4.4.10 Табличный отчет о токсикологических исследованиях, включенных в обзор
2.4.3.2 Фармакология безопасности	2.4.5. Обобщающий обзор и выводы
2.4.4 Токсикология	2.4.6. Список использованной литературы
2.4.4.1 Острая токсичность	

ОБЗОР КЛИНИЧЕСКИХ ДАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

По аналогии с обзором доклинических исследований (данных) обзор клинических исследований должен дублировать по структуре отчет клинических исследований (в соответствии с ФЗ № 61) или соблюдать

структуру, устоявшуюся в документах ICH, применимую к общему техническому документу.

Пример план обзора клинических данных (модуль 2.5 ОТД):

2.5.1. Обоснование разработки препарата	2.5.4.1. Клинические исследования и исследуемая популяция
2.5.2. Обзор биофармацевтических данных	2.5.4.2. Дозировка и длительность лечения
2.5.2.1. Биодоступность	2.5.5. Обзор безопасности
2.5.2.2. Биоэквивалентность	2.5.5.1. Мировой опыт по безопасности
2.5.3. Обзор клинической фармакологии	2.5.5.1.1. Противопоказания
2.5.3.1. Фармакокинетика	2.5.5.1.2. Особые предостережения и меры предосторожности в использовании
2.5.3.1.1. Абсорбция/Всасывание	2.5.5.1.3. Беременность и лактация
2.5.3.1.2. Распределение, Связывание с белками	2.5.5.1.4. Влияние на способность управлять автомобилем и работать с техникой
2.5.3.1.3. Метаболизм	2.5.5.1.5. Нежелательные эффекты
2.5.3.1.4. Выведение	2.5.5.1.6. Передозировка
2.5.3.1.5. Фармакокинетика у особых групп населения	2.5.5.2. Постмаркетинговый опыт
2.5.3.2. Фармакодинамика	2.5.6. Выводы о пользе и риске
2.5.3.3. Взаимодействия	2.5.7. Список использованной литературы
2.5.4. Обзор эффективности	

Принципы обзора клинических исследований с позиции доказательной медицины будут изложены в следующем разделе статьи.

У читателя также может возникнуть вопрос относительно отличия в наполнении модулей 2.4 (обзор) и 2.6 (резюме) и модуля 4 (отчет) для доклинических данных, аналогично и 2.5, 2.7 и модуля 5 в случае клинических данных. По логике Общего технического документа, представляющего собой гармонизированный подход ICH CTD объем и подробность изложения модулей должен увеличиваться от меньшего значения к большему. Так, 2.4 представляет собой краткий обзор и критическую оценку всех проведенных исследований, 2.6 таким образом – краткое описание каждого отдельного исследования, а модуль 4 – развернутое описание каждого индивидуально-исследования или исследований, иными словами отчет о доклиническом (их) исследованиях. Такова же логика и для клинического обзора, резюме и отчета о клиническом исследовании в модулях 2.5, 2.7 и 5, соответственно.

Вновь вернемся к вопросу наполнения модулей 2.6 и 2.7. В тех случаях, когда собственные данные для регистрации препаратов не требуются (хорошо изученные – но обратите внимание, что их критерии не только 10 лет и 3 страны, а еще критерии из приложения № 1 к Правилам регистрации; фитопрепараты и гомеопатия) в данных разделах досье формируется электронный файл, где указывается «Не применимо к данному виду заявления на регистрацию».

Таблица 1.

Перечень наиболее популярных библиографических баз данных для подготовки обзоров научных работ для государственной регистрации лекарственных средств

Ресурс	Комментарии
www.pubmed.com	Крупнейшая библиографическая база данных в биомедицинской отрасли
http://www.cochranelibrary.com/	Содержит ценную информацию о кохрановских обзорах
http://www.lookchem.com/	База данных о химических соединениях
https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/	База данных о химических соединениях
http://www.aldrichmarketselect.com/	База данных действующих веществ
https://toxnet.nlm.nih.gov	База данных по токсикологии
https://ntp.niehs.nih.gov/	База данных по токсикологии
https://scholar.google.ru	База данных по научной литературе с упрощенным поисковым интерфейсом в привычном диалоговом формате
http://elibrary.ru	Крупнейшая база данных российских научных периодических изданий
www.cyberleninka.ru/	База данных российских научных периодических изданий с открытым доступом к полному тексту
www.drugs.com	База данных лекарственных препаратов, одобренных FDA
https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/	Отчеты и обзоры для FDA от компаний-спонсоров
http://www.pubfacts.com/	Портал-компилятор данных CNKI, VIP, WanFang, SinoMed, PubMed, Cochrane Library, и clinicaltrials.gov
http://www.science.gov/	Американский портал с публикацией данных научных исследований, в том числе лекарственных средств
http://www.refdoc.fr	Отсылочная база данных по научно-техническим ссылкам Франции
https://www.jstage.jst.go.jp/browse	Japan Science and Technology Agency
https://www.tib.eu	German National Library of Science and Technology
www.clinicaltrials.gov	База данных клинических исследований США
www.grls.ru	База данных клинических исследований Российской Федерации
https://www.clinicaltrialsregister.eu	Европейская база данных клинических исследований
http://www.hra.nhs.uk/	Департамент клинических исследований Соединенного Королевства

Для генерических лекарственных препаратов, подаваемых по общей процедуре в разделе 2.6. – указывается в файле «не применено...», в разделе 2.7. – дается резюме БЭИ. Для генерических лекарственных препаратов, подаваемых по процедуре биоэквивалента в разделе 2.6. – аналогично, в разделе 2.7. – дается резюме отчета о применении процедуры биоэквивалента (анализ растворимости АФИ и его физико-химических свойств с точки зрения биофармацевтических аспектов, анализ пропорциональности дозировок, ТСКР и анализ фармакологических рисков).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ БАЗЫ ДАННЫХ И ОБЪЕМ ИНФОРМАЦИОННОГО ПОИСКА

Обзор литературы в контексте регистрации воспроизведенного лекарственного средства приобретает одно из важнейших позиций. В данной статье предлагается кратко рассмотреть основные этапы работы с медицинской информацией:

- ✓ Информационный поиск
- ✓ Критическая оценка информации
- ✓ Систематизация научных данных

Ключевыми источниками информации для поиска научной информации становятся библиографические базы данных, библиографические каталоги научных библиотек и каталоги серой литературы. В качестве примера можно привести ряд наиболее используемых баз (таблица 1).

При многообразии баз данных стоит помнить о трудоемкости процесса поиска, первичного ознакомления с источником и его критической оценки. Обычно такие задачи передаются отдельному должностному лицу (райтеру, менеджеру по клиническим исследованиям или медицинскому советнику) в штате медицинского отдела, или отдела по регистрации лекарственных средств. В случае больших объемов по регистрации функция может быть передана на аутсорс специализированным информационным службам.

Поиск осуществляется по наборам типовых ключевых слов и определенным элементам поисковых словарей (наиболее популярен Mesh – элемент поисковой лексики в системе Pubmed). Поиск может осуществляться как с помощью упрощенного интерфейса – поисковую строку, так и через конструктор поисковых запросов с использованием булевских операторов.

После подбора пула высоко релевантных статей по различным аспектам доклинической и клинической фармакокинетики и фармакодинамики, токсикологии важным элементом становится отбор информации и оценка ее качества.

В данном случае, мы рекомендуем использовать стандартную шкалу доказательности данных в рамках дизайна проведенного исследования, где наиболее доказательными становятся рандомизированные клинические исследования с последующим мета-анализом, имеющее хотя бы одно РКИ, контролируемые исследования, неконтролируемые наблюдательные исследования и экспертные мнения. Соответственно, при первичном анализе мы можем разделить накопленную научную информацию по методу ее по-

лучения в соответствии с дизайном исследования, в последствии при большом количестве исследования мы можем остановиться на уровне доказательности первого класса и углубиться в анализ качества мета-анализов или РКИ на основании шкал: SPIDER, PICO [12], AMSTAR[13] и пр. При отсутствии РКИ – сделать вывод о качестве нерандомизированных контролируемых исследований и т.д. Как видит читатель в данном случае все зависит от количества представленной информации и возможности, в принципе, использовать фильтрацию для включения исследования в обзор исходя из методологии качества.

Стоит отметить, что в ряде случаев при перерегистрации лекарственного средства или первичной подачи препарата, которые находится в обороте достаточно давно мы сталкиваемся с ситуацией, когда массив накопленных данных является неудовлетворительным с точки зрения методологического качества работ, в таком случае на первый план должна выходить полнота анализа информации в соответствии с хронологией оборота препарата, детальность описания имеющихся данных с указанием неполноты каждого отдельного исследования, возможным проведением сетевых и непрямых сравнений эффективности и безопасности лекарственного препарата.

ВАЛИДАЦИЯ ДОСТОВЕРНОСТИ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ

Стоит также упомянуть о заимствовании мировой практики сбора копий литературных источников, которые были использованы при подготовке обзоров научных данных для регистрационного досье по новым требованиям ЕАЭС. Речь идет о систематизации (в первичном виде) той информации, которая была использована в процессе подготовки обзора литературы. Такими источниками могут быть оригиналы статей в периодических научных журналах, абстракты и аннотации статей, монографии, материалы тезисов и конференций, серая литература, в том числе диссертации (и их авторефераты). Расположение копий литературных источников в общем техническом документе предусмотрена в позиции 2.7.5 [7].

Основная цель предоставления копий литературных источников – валидация и объективизация того массива первичных литературных данных, который был задействован при подготовке обзора научных работ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменения федерального законодательства и геополитические факторы привели к трансформации досье лекарственного средства для государственной регистрации. Обзор научных работ стало возможным

предоставлять в качестве дополнения, а в ряде случаев и замены документации по собственным доклиническим и клиническим исследованиям Спонсора.

Таким образом, появляется необходимость в развитии компетенций по библиографическому поиску и критической оценке методологии качества работ, и синтезу аналитических обзорных текстов для сопровождения регистрации лекарственных средств воспроизведенных лекарственных средств.

Трудности при подготовке обзоров научных работ можно подразделить на несколько направлений в зависимости от накопленной доказательной базы изучения и применения препарата: подбор минимально необходимого количества научных работ по изучаемому препарату, например в ситуации доклинического модуля для давно зарегистрированного препарата отечественного производства, или, как например, в ситуации с динамически развивающимися направлениями, ориентация в большом массиве информации, критическая оценка большого количества работ, оценка их методологии. Также определенные трудности может вызывать работа с оригинальными документами на редких языках и навыки академического письма при подготовке текста, не говоря уже о трудоемкости самого обзорного процесса.

В любом случае вне зависимости от формата обзора научных работ регулятор хочет видеть аргументированную позицию Заявителя о балансе польза-риск при применении референтного препарата и определение целесообразности и необходимости дополнительных исследований описываемого лекарственного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bordens K., Abbott B.* Reviewing the Scientific Literature // *Research Designs and Methods.* 2004. С. 63–94.
2. *Pollock A., Berge E.* How to do a systematic review // *International Journal of Stroke.* 2017. Т. 13. № 2. С. 138–156.
3. Об обращении лекарственных средств. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61: ред. 04.06.2018. [Ob obrashchenii lekarstvennyh sredstv. Federal'nyj zakon ot 12 aprelya 2010 g. № 61: red. 04.06.2018.] [On circulation of medicines. Federal law № 61 of 12 April 2010.: ed. 04.06.2018.] Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/ (accessed 22.08.2018).
4. О внесении изменений в Федеральный закон Об обращении лекарственных средств. Федеральный закон от 22 декабря 2014 г. № 429: ред. 22.12.2014. [O vnesenii izmenenij v Federal'nyj zakon Ob obrashchenii lekarstvennyh sredstv. Federal'nyj zakon ot 22 dekabrya 2014 g. № 429: red. 22.12.2014.] [On amendments to the Federal law on circulation of medicines. Federal law № 429 of 22 December 2014.: ed. 22.12.2014.] Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_172505/ (accessed 22.08.2018).
5. ГОСТ Р 7.0.11–2011. Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления // Москва: РОССТАНДАРТ. Дата обновления: 16 июня 2015. [GOST R 7.0.11–2011. Dissertaciya i avtoreferat dissertacii. Struktura i pravila oformleniya // Moskva: ROSSTANDART. Data obnovleniya: 16 iyunya 2015.] [GOST R 7.0.11–2011.

- Dissertation and dissertation abstract. The structure and rules of registration // Moscow: ROSSTANDART. Updated: June 16, 2015.] Available at: <http://gost.ru> (accessed 24.08.2018).
6. ГОСТ Р 7.32–2001. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления // Москва: РОССТАНДАРТ. Дата обновления: 16 июня 2015. [GOST R 7.32–2001. Otchet o nauchno-issledovatel'skoj rabote. Struktura i pravila oformleniya // Moskva: ROSSTANDART. Data obnovleniya: 16 iyunya 2015.] [GOST R 7.32–2001 Report on research work. The structure and rules of registration // Moscow: ROSSTANDART. Updated: June 16, 2015.] Available at: <http://gost.ru> (accessed 24.08.2018)
 7. О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения. Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 78 от 03.11.2016 г. [О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения. Reshenie Soveta Evrazijskoj ehkonomicheskoy komissii № 78 ot 03.11.2016 g.] [On the Rules of registration and examination of medicines for medical use. Decision of the Council of the Eurasian economic Commission № 78 dated 03.11.2016] Available at: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411969/cncd_21112016_78 (accessed 22.08.2018).
 8. DACENTA. A review of organisational and patient-related assessments in HTAs published by INAHTA members / Danish Centre for Health Technology Assessment.—National Board of Health: 2007. С. 131.
 9. О Требованиях к электронному виду заявлений и документов регистрационного досье, представляемых при осуществлении регистрации и экспертизы лекарственных препаратов для медицинского применения. Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 79 от 30.06.2017. [О Требованиях к электронному виду заявлений и документов регистрационного досье, представляемых при осуществлении регистрации и экспертизы лекарственных препаратов для медицинского применения. Reshenie Soveta Evrazijskoj ehkonomicheskoy komissii № 79 ot 30.06.2017.] [On the Requirements for electronic form of statements and documents of the registration dossier provided during the registration and examination of medicinal products for medical applications. The decision of the Council of the Eurasian economic Commission № 79 from 30.06.2017.] Available at: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71611336/> (accessed 22.08.2018).
 10. Рождественский Д. А. Приведение досье лекарственного препарата в соответствие с требованиями ЕАЭС. [Rozhdestvenskij D. A. Privedenie dos'e lekarstvennogo preparata v sootvetstvie s trebovaniyami EAEHS.] [Ghost dossier of a medicinal product in accordance with the requirements of the EEC.] Available at: <http://www.eurasiancommission.org/ru/act/texnreg/deptexreg/LS1/Documents/Рождественский%20АдамСмит%202017.pdf> (accessed 22.08.2018 г.)
 11. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. – М.: Гриф и К, 2014. С. 328. [Rukovodstvo po ehkspertize lekarstvennyh sredstv. Tom I. – М.: Grif i K, [Guidelines for the examination of medicines. V. I – М.: Fretboard.] 2014. P. 328.]
 12. Cooke A, Smith D, Booth A. Beyond PICO. / 1Cooke A, Smith D, Booth A. Beyond // Qual Health Res. 2012. T.22. № 10. С.1435–1443.
 13. Shea B. J., Hamel C., Wells G. A., Bouter L. M. et al. AMSTAR is a reliable and valid measurement tool to assess the methodological quality of systematic reviews. / J Clin Epidemiol. 2009. T. 62. № 10. С. 1013–1020.



ЛАБОРАТОРНАЯ ПЛАТФОРМА ПРЕДПРИЯТИЯ LabWare

Материал предоставлен
компанией LabWare

ВВЕДЕНИЕ

Компания LabWare получила всеобщее признание и является мировым лидером в предоставлении решений по автоматизации лабораторий предприятий. Платформа LabWare включает в себя решения LabWare LIMS и LabWare ELN (Электронный лабораторный журнал).

Платформа LabWare позволяет выйти на новый уровень контроля и управления процессами на предприятии, повысить производительность и качественные показатели, а также снизить общие риски, затраты и стоимость конечной продукции.

В совокупности, возможности LabWare позволят Вам не только оптимизировать и автоматизировать процессы лаборатории, но в то же время повысить эффективность и качество, а в результате и ценность портфеля корпоративных систем.

Лабораторная платформа LabWare является уникальным в своем роде, мощным единым механизмом для решения задач по автоматизации лабораторий.

ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ LabWare

Основным отличием от других поставщиков решений по автоматизации лабораторий является единая концепция развития платформы LabWare с применением эволюционного подхода и использованием модульной архитектуры.

LabWare является современным, технически совершенным продуктом и относится к промышленным ЛИМС класса COTS (Commercial Off-The-Shelf) – «полнофункциональная система готовая к использованию».

удовлетворенности клиентов является процент удержания клиентов.

Простая фраза «Results Count» («Результат подтвержден») более 15 лет является лозунгом LabWare, поскольку мы признаем, что реальной ценностью для Заказчика является не то, что мы обещаем, а то, что мы делаем.

На протяжении длительного периода времени LabWare доказывает, что это не пустые слова, подкрепляя их результатами, среди которых: успешные внедрения в различных отраслях промышленности; опыт реализации как локальных, так и глобальных широкомасштабных проектов; проектирование корпоративных систем для одновременного использования на разных континентах с учетом использования различной нормативной документации и национальных языков.

LabWare гордится тем, что добилась успеха в решении этих задач, что подтверждается количеством и лояльностью наших Заказчиков.

Начиная с момента появления программного продукта в середине 1990-х годов, степень удержания Заказчиков LabWare превышает 98%, что является основным доказательством того, что LabWare всегда выполняет свои обязательства и соответствует как исходным, так и будущим ожиданиям Заказчиков.

ПРЕИМУЩЕСТВА LabWare ELP

Типовые процессы лабораторий предприятий можно разделить на две сферы деятельности. Одна из них касается аспектов функционирования лаборатории, включая полный жизненный цикл образца, управление ресурсами, мониторинг качества измерений и хранение накопленных со временем данных.

Данная сфера деятельности классифицируется как Лабораторная информационная менеджмент система (LIMS).

Другая сфера связана с научной деятельностью, которая позволяет проводить эксперименты и вести записи структурированных и неструктурированных данных, а также осуществлять контроль выполнения испытаний.

Данный вид деятельности может быть автоматизирован при помощи Электронного лабораторного журнала (ELN).

Как правило, эти два программных продукта развиваются независимо друг от друга и, зачастую, представляют собой отдельные приложения, которые необходимо объединять с помощью различных интерфейсов. Время показало, что такой подход является затратным и сложным в реализации,

не говоря уже о проблемах дальнейшего развития и поддержки.

LabWare решает данную проблему раз и навсегда!

LabWare ELP объединяет возможности LIMS и ELN в рамках единой платформы.

Единая интегрированная платформа LabWare ELP предоставляет полный функционал LIMS и ELN и общую систему управления и конфигурирования без использования промежуточных специфических интерфейсов интеграции, которые неизбежно влекут за собой дополнительные затраты на проектирование, разработку и валидацию системы.

LabWare ELP являет собой симбиоз решений LIMS и ELN, которые напрямую взаимодействуют друг с другом и используют единую базу данных. LabWare ELP исключает дублирование – все компоненты конфигурации и общие объекты данных присутствуют в единичных экземплярах и доступны к использованию в рамках всей платформы, что важно для обеспечения поддержки бизнес-процессов предприятия.

Решение LabWare одинаково хорошо подходит как для небольших локальных или мобильных лабораторий, так и крупных глобальных компаний с лабораториями по всему миру.

LabWare решает Ваши задачи и снимает вопросы, какие системы лучше всего подойдут для автоматизации Вашей лаборатории и в какие технологии следует инвестировать средства для поддержания и развития бизнеса.

LabWare – ЛИДЕР СРЕДИ ОТРАСЛЕВЫХ LIMS

С момента появления на рынке LabWare LIMS стал наиболее технически развитым LIMS-решением и сохраняет эту позицию по сей день.

Лицензирование – наш подход лицензирования уникален и не зависит от количества или состава необходимых Вам модулей, так как все функциональные модули LabWare уже включены и будут доступны Вам в полном объеме, даже в случае приобретения одной единственной лицензии.

Система является универсальной и одинаково хорошо подходит для использования в небольших лабораториях, так и в масштабах крупной корпорации с тысячами сотрудников.

LabWare предлагает различные варианты развертывания и интеграции, а также обширный набор функциональных модулей, которыми можно комбинировать в зависимости от условий и Ваших требований к системе.

Функционал сбора данных с оборудования уже заложен в системе, и более того существует база настроенных интерфейсов для различных моделей оборудования.

LabWare предоставляет мощную систему с полностью интегрированными инструментами для ее адаптации в соответствии с потребностями конечных пользователей, что никоим образом не влияет на предоставление услуг технической поддержки и будущие обновления системы.

LabWare предлагает использовать проверенные и уже настроенные компонентные решения для отраслей. Решения разработаны в соответствии с потребностями, характерными для определенных отраслей промышленности, и служат для: сокращения ресурсов и сроков внедрения; снижения затрат на настройку и тестирование системы, следовательно, и снижения стоимости проекта в целом.

В процессе внедрения LabWare применяет подход, который предполагает интенсивный процесс передачи знаний и опыта представителям Заказчика, чтобы в дальнейшем они обладали достаточной квалификацией для обеспечения поддержки и развития LIMS без необходимости привлечения консультантов LabWare.

Будьте уверены, что у клиентов LabWare не возникает таких проблем как скрытые расходы, неудовлетворительный результат внедрения или ограничения в развитии системы LabWare.

Ключевым параметром любого технически продвинутого решения является его независимость от платформы или бренда, что дает Заказчику, максимальную свободу выбора аппаратного обеспечения, операционных систем или баз данных. С этой точки зрения LabWare является непревзойденной гибкой системой.

LabWare работает с любой реляционной базой данных, включая самые популярные (Oracle и SQL Server), а также может быть развернуто в различной топологии с разными пользовательскими интерфейсами. Полностью поддерживается централизованная, децентрализованная и/или кластерная установка; как тонкий клиент; как толстый клиент или как комбинация типов в зависимости от Ваших потребностей.

Работа в системе может быть организована как через стационарные рабочие станции, так и через персональные или мобильные устройства. LabWare предоставляет специально разработанные инструменты для интеграции с другими популярными приложениями, такими как SAP или Waters Empower, а также обширную библиотеку веб-сервисов, которые позволят создавать Ваши собственные программные интерфейсы.

В результате Вы получите высокоэффективную ЛИМС в сжатые сроки, которая позволит повысить уровень качественных показателей, прослеживаемости и общей производительности, что напрямую будет влиять на экономический эффект предприятия в целом.

ПРЕИМУЩЕСТВА LABWARE

Выбор информационной системы для лаборатории всегда является определяющим фактором и открывает перспективы дальнейшего развития организации в целом.

Продукты LabWare востребованы в самых разных отраслях промышленности. LabWare занимается исключительно лабораторной системой и разрабатывает, поддерживает и распространяет ЛИМС, которая давно зарекомендовала себя на мировом рынке.

LabWare является финансово стабильной компанией с глобальной инфраструктурой и технической под-





Шаблонные отраслевые решения



держки. Интернациональная команда LabWare состоит исключительно из профессионалов в области лабораторных систем.

LabWare никогда не придерживалась стратегии роста за счет поглощения или развития сети дистрибьюторов, поэтому развитие платформы LabWare происходило в соответствии с четким продуманным планом и фокусом на потребности клиентов.

Платформа LabWare ELP предоставляет широкий спектр функциональности и значительные преимущества для бизнеса в рамках единого решения LIMS и ELN.

ШАБЛОННЫЕ ОТРАСЛЕВЫЕ РЕШЕНИЯ LabWare

Компания LabWare непрерывно инвестирует в развитие продукта, чтобы Заказчики применяли только наилучшие мировые практики. Наша цель – быть уверенными в том, что наши Заказчики получают максимальную выгоду и оптимально используют потенциал системы LIMS, которая способствует развитию бизнеса.

Дополнительная ценность LabWare заключается в предоставлении шаблонных отраслевых решений. Возможность гибкой настройки позволяют применять единое валидированное ядро в самых разных отраслях промышленности, каждая из которых имеет собственную специфику бизнес-процессов и требований.

Система LabWare хранит в базе данных всю конфигурацию в форме шаблонов, которая постоянно пополняется путем развития в узконаправленных отраслях промышленности. Шаблоны доступны для консультантов LabWare и являются бесплатными для наших Заказчиков.

С помощью шаблонных решений LabWare успешно реализовала более 1000 проектов по всему миру, включая мультисайтовые глобальные системы. Непосредственное участие Заказчиков в проектах позволяет LabWare повышать качественный уровень не только шаблонных решений, но и сопроводительных материалов, программ обучения, документации и степени валидации системы.

Шаблонные решения – это мощный инструмент и отличительная черта LabWare, возможности которого постоянно расширяются и позволяют нашим Заказчикам достигать наилучшего результата.

ПРАКТИКА ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ УСЛУГ

Фокусирование на автоматизации лабораторий – является тем преимуществом, которое позволяет LabWare доминировать на фоне других компаний.

Решения LIMS и ELN являются стратегическими направлениями деятельности компании.

Залогом успеха является слаженная работа квалифицированной команды специалистов LabWare в данной области деятельности. Среднестатистический консультант LabWare имеет более 10 лет опыта работы по своему направлению. Данный аспект открывает неограниченные возможности перед нашими Заказчиками и обеспечивает успешные внедрения, как на небольших предприятиях, так и в рамках крупных международных корпораций.



ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

К публикации принимаются законченные оригинальные работы (до 25 машинописных страниц, включая иллюстративный материал и список литературы), рассматривающие экспериментальные исследования в области фармацевтической технологии и разработки, вопросы оценки качества, эффективности, безопасности воспроизведенных и оригинальных лекарственных средств и регистрации лекарственных средств.

Журнал также публикует предлагаемые авторами и одобренные редакционной коллегией обзорные статьи по актуальным проблемам фармацевтической технологии, разработки и регистрации лекарственных средств (до 40 машинописных страниц, включая иллюстративный материал и список литературы, содержащий не менее 20 ссылок).

Работы приоритетного характера (1–3 машинописные страницы), содержащие не более 3 иллюстраций, публикуются в виде коротких сообщений.

Текст статьи должен быть представлен в редакцию на адрес электронной почты: info@pharmjournal.ru, набранным в текстовом редакторе MS Word, версии не ниже 2003. Название файла – фамилия первого автора. Редакция не несет ответственности за содержание и достоверность представленного материала.

Первая страница статьи начинается с УДК и названия статьи на русском языке, напечатанного заглавными буквами по центру. Далее следует список авторов на русском языке. Для каждого автора указываются инициалы и фамилия, сначала пишутся инициалы, потом фамилия автора. Инициалы отделяются от фамилии автора одинарным пробелом. Затем следуют точные названия и адреса (с обязательным указанием почтового индекса) всех учреждений (с цифровой пометкой, где работает каждый из авторов), звездочкой в верхнем регистре помечен автор, ответственный за переписку (* – ссылка на телефон и адрес электронной почты). Редакция не несет ответственности за искаженное воспроизведение имен собственных, допущенное по вине автора.

Затем приводится краткое резюме статьи (Резюме.) на русском языке (250–300 слов по Scopus). Далее следуют ключевые слова (Ключевые слова:) (не менее 5–10) на русском языке.

Далее в том же порядке: название статьи заглавными буквами по центру, список авторов с указанием точных названий и адресов с почтовым индексом всех учреждений/организаций (так же с цифровой пометкой в верхнем регистре указывающей, где работает каждый из авторов), авторский ORCID и ResearcherID (при наличии), краткое резюме (Abstract.) и ключевые слова статьи (Keywords:) в переводе на английский язык (см. Образец).

Текст экспериментальной статьи и коротких сообщений должен быть разбит на разделы: 1) ВВЕДЕНИЕ; 2) МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ; 3) РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ; 4) ЗАКЛЮЧЕНИЕ; 5) ЛИТЕРАТУРА (все буквы в названиях разделов – заглавные).

Все сокращения и аббревиатуры, использованные в тексте статьи, должны быть расшифрованы (либо при первом употреблении в скобках, либо в конце статьи в списке сокращений). Расшифровка сокращений и аббревиатур иноязычных терминов должна быть представлена на языке оригинала.

Правила набора. Интервал между словами должен быть один пробел, перенос слов не делать, текст набирается шрифтом Times New Roman, 14 кеглем через 1,5 интервала. Название статьи набирается заглавными буквами полужирным шрифтом, инициалы и фамилии авторов полужирным шрифтом. При обозначении единиц измерения должна использоваться система единиц СИ (см. Примеры). Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии – группировочного или химического названия. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств. При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов.

При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производитель и страну происхождения [Пример: хлористоводородная кислота, х.ч. (Сигма Тек, Россия)]. При описании специфических импортных реактивов [Пример: из каталога Sigma-Aldrich] необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива.

При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производитель,

страну происхождения, серию и срок годности [Пример: Синдролон таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 4 мг, производства ФАРМАТЕН С.А., Греция, серия 1100638, срок годности до 05.2013].

При описании используемых стандартных образцов приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [Пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9%, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацеутикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производитель и страну происхождения [Пример: прибор для теста «Растворение» DT 720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производитель, страну происхождения [Пример: ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США].

При приведении в работе первичных данных аналитических исследований (спектров, хроматограмм, калибровочных графиков) их необходимо приводить в цвете в прослеживаемом формате, с четкими разборчивыми подписями осей, пиков, спектральных максимумов и т.д.). Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии – группировочного или химического названия.

Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

Все данные, представляемые в таблицах, графиках и на рисунках должны хорошо читаться. Преимущественно эти данные рекомендуются приводить в черно-белой графике. Если единицы измерения на осях графиков представлены на английском языке, рекомендуется указать их перевод.

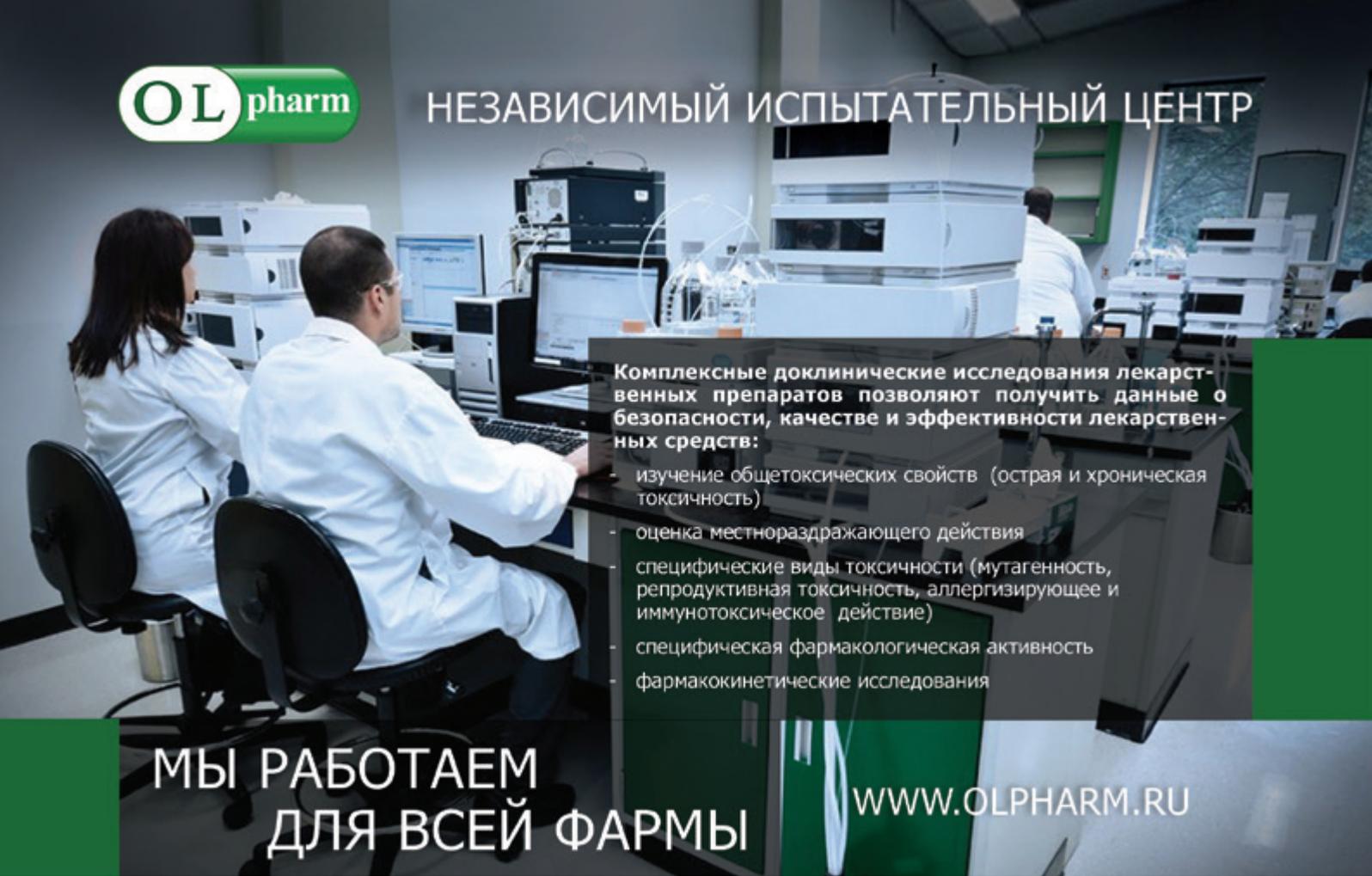
В тексте статьи обязательно указывать ссылки на соответствующие рисунки и таблицы в круглых скобках: (таблица 1), (рисунок 1).

К статье необходимо приложить список всей цитируемой литературы, оформленный в соответствии с действующим ГОСТ Р 7.0.5-2008 (см. Оформление ссылок). В тексте статьи следует указывать номер ссылки в квадратных скобках цифрами в соответствии с приставленным списком литературы и после запятой страницу источника, с которого приводится цитата. Ссылки нумеруются в порядке цитирования. Перед списком указывается ЛИТЕРАТУРА прописными буквами. Список литературы должен представлять собой полную затекстовую ссылку. Все источники располагаются в алфавитном порядке. Вначале указываются источники на русском языке, затем – на иностранных. Для книг и сборников указываются точные названия по титульному листу, место и год издания, страницы; для нормативных документов – тип документа и принявший его орган (постановление Правительства Российской Федерации, приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации и т. п.), дата утверждения, номер и точное название. Для журнальных статей указываются фамилия и инициалы авторов, полное название статьи, название журнала, год, номер выпуска, номера страниц. Все ФИО авторов в литературе выделяются курсивом.

Возле каждого источника в квадратных скобках приводится транслитерация и перевод русскоязычных источников на английский язык. Для автоматической транслитерации в латиницу рекомендуется обращаться на сайт <http://translit.net> (стандарт транслитерации – BSI).

Вся литература должна быть оформлена 10 кеглем с одинарным интервалом.

Обращаем внимание авторов, что статьи, не соответствующие требованиям к оформлению, рассматриваться не будут или автору будет предложено оплатить работу сотрудника редакции для технического переоформления материала под требования ВАКовского журнала!



Комплексные доклинические исследования лекарственных препаратов позволяют получить данные о безопасности, качестве и эффективности лекарственных средств:

- изучение общетоксических свойств (острая и хроническая токсичность)
- оценка местнораздражающего действия
- специфические виды токсичности (мутагенность, репродуктивная токсичность, аллергизирующее и иммуотоксическое действие)
- специфическая фармакологическая активность
- фармакокинетические исследования

МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВСЕЙ ФАРМЫ

WWW.OLPHARM.RU

Исследования в области микробиологии

- исследование и тестирование чувствительных патогенных микроорганизмов к антимикробным лекарственным средствам
- изучение антимикробного действия лекарственных средств в отношении определенных видов микроорганизмов во избежание неправильной оценки полученных результатов перед испытанием на микробиологическую чистоту и стерильность
- анализ антагонистической активности пробиотических штаммов и препаратов на их основе методом отсроченного антагонизма на плотной среде в чашках Петри



Исследования в области разработки лекарственных средств

- разработка и валидация аналитических методик
- стандартизация НД на лекарственные препараты
- изучение стабильности лекарственных средств
- изучение кинетики растворения
- исследование фармакокинетики в рамках проведения биоэквивалентности
- проведение трансфера методик

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21ФЛ10
от 08.10.2014

Лицензия № 77.01.13.001.Л.000142.04.09
от 30.04.2009 на выполнение работ с
микроорганизмами 3-4 групп патогенности

ООО «ОЛФАРМ»
117105, Г. МОСКВА,
УЛ. НАГАТИНСКАЯ, Д. 3А
ТЕЛ./ФАКС: +7 (499) 611-40-36
E-MAIL: INFO@OLPHARM.RU



LABWARE
lims

LABWARE
eln

LABWARE

Компания LabWare признанный мировой поставщик
Лабораторных информационных менеджмент систем
с более чем 30-ти летним опытом:

- Более 1500 компаний и свыше 100 000 пользователей ежедневно работают в ЛИМС LabWare;
- LabWare охватывает 5 континентов и более 130 стран мира.

Основные преимущества продукта LabWare:

- ЛИМС LabWare подходит для любой отрасли вне зависимости от масштаба предприятия и области деятельности лаборатории;
- Полнофункциональный конфигурируемый продукт класса GAMP;
- Полная локализация пользовательского интерфейса;
- Возможность реализации любых задач современной лаборатории при помощи более чем 600 модулей;
- Широкие возможности интеграции со смежными автоматизированными системами и оборудованием любой сложности
- Соответствие как международной, так и отечественной нормативной документации;
- Преемственность и естественная миграция данных при переходе на новые версии.

Выбирая LabWare, Вы можете быть уверены, что получите:

- Лучший продукт на мировом рынке ЛИМС;
- Надежного и ответственного партнера в долгосрочной перспективе;
- Максимальную отдачу и быстрый возврат инвестиций;
- Основанную на передовых технологиях ЛИМС, которая будет расти и развиваться вместе с Вашей компанией.



На территории России и стран СНГ представлять
компанию LabWare уполномочено ООО "ЛАБВЭА"

ООО "ЛАБВЭА" г. Москва, тел.: +7 (495) 134 3747, e-mail: info@labware.ru
www.labware.ru

www.labware.com