

# РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

RESEARCH &amp; PRODUCTION JOURNAL

## DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION



СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ



# ЦФА

## 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

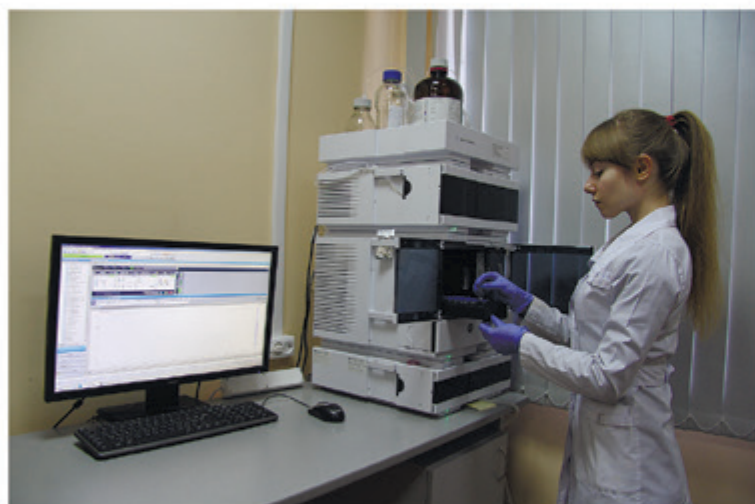
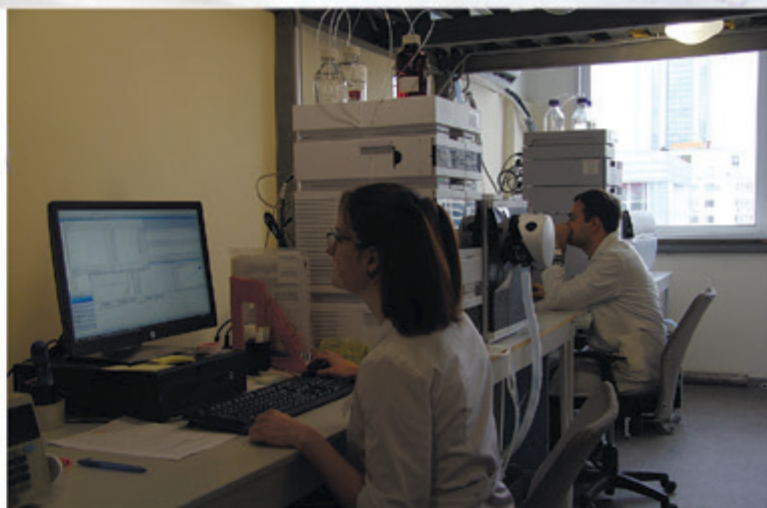




ООО «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА») – сертифицированный по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) лабораторный центр, выполняющий высококачественные исследования в области разработки и контроля инновационных и воспроизведенных лекарственных средств, что является крайне актуальным с учетом действующих государственных программ развития фармацевтической промышленности (Фарма-2020)

## Основными видами деятельности центра являются:

- биоаналитические исследования (аналитический этап исследований биоэквивалентности, доклинических исследований и 1 фазы клинических исследований) хими-ко-фармацевтических лекарственных средств, нано-препаратов 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



## Область сертификации:

- научно-исследовательская работа;
- проведение биоаналитических исследований;
- проведение фармакокинетических исследований;
- проведение СТР (сравнительного теста кинетики растворения)



ООО «ЦФА»  
117246, город Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Тел.: +7 (499) 281-81-11  
www.cpha.ru E-mail: info@cpha.ru

Система менеджмента ООО «ЦФА» сертифицирована по требованиям стандартов: GLP (ГОСТ 33044-2014) в системе Сертификации Русского Регистра, свидетельство Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт), № Сертификата 16.1112.026 от 13 апреля 2018 г. Сертификат действителен до 3 августа 2019 г.; ГОСТ Р ИСО 9001:2015 в системе Ассоциации по сертификации «Русский Регистр» с аккредитацией Федеральной службы по аккредитации РФ (Росаккредитации), № Сертификата 18.1497.026 от 5 сентября 2018 г. Сертификат действителен до 5 сентября 2021 г.; международного стандарта ISO 9001:2015 в системе Сертификации Русского Регистра, участника международного форума по аккредитации IAF, сертификат соответствия единого образца IQNet, № Сертификата 18.1498.026 от 5 сентября 2018 г. Сертификат действителен до 5 сентября 2021 г. Область сертификации: научно-исследовательская работа, проведение биоаналитических исследований, проведение фармакокинетических исследований, проведение СТР (сравнительного теста кинетики растворения).



РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ISSN 2305-2066

RESEARCH &amp; PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT &amp; REGISTRATION

**Учредитель**

ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)  
Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования Первый Московский  
государственный медицинский университет имени  
И.М. Сеченова Министерства здравоохранения  
Российской Федерации (Сеченовский Университет)  
Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Сибирский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Издатель**

ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)

**Директор журнала**

Н. В. Кульджанова

**Заведующий редакцией**

Н. С. Михайлова

**Редакционная коллегия****Главный редактор:**

И. Е. Шохин, д.фарм.н.

[info@pharmjournal.ru](mailto:info@pharmjournal.ru)**Редакторы**

|                                  |                                      |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| Ю. И. Аммур, к.биол.н.           | Е. С. Мельников, к.фарм.н.           |
| М. В. Белоусов, проф., д.фарм.м. | Р. И. Мустафин, к.фарм.н.            |
| Боян Салия, доц., к.фарм.н.      | Н.А. Оборотова, проф., д.фарм.м.     |
| (Сербия)                         | В. В. Попов, проф., д.м.н.           |
| И. А. Василенко, проф., д.х.н.   | В. Л. Русинов, чл.-корр. РАН, д.х.н. |
| В. В. Хуторянский, к.х.н., Prof. | Ю. А. Скорик, доц., к.х.н.           |
| (Великобритания)                 | А. И. Сливкин, проф., д.фарм.н.      |
| К. С. Гузев, д.ф.н.              | И. Е. Смехова, д.фарм.н.             |
| Д. А. Гусаров, к.х.н.            | Я. М. Станишевский, проф., д.х.н.    |
| Н. Б. Демина, проф., д.фарм.н.   | Г. В. Сукоян, д.б.н. (Грузия)        |
| С. В. Емшанова, д.фарм.н.        | Б. Б. Сысуюев, доц., д.фарм.н.       |
| Т. Н. Комаров, к.фарм.н.         | В. Н. Ташлицкий, к.х.н.              |
| Ю. И. Кулинич, к.фарм.н.         | О. В. Тринеева, д.фарм.н.            |
| О. Г. Макеев, проф., д.м.н.      | В. С. Чучалин, д.фарм.н.             |
| Е. А. Малашенко, к.фарм.н.       | Н. А. Эпштейн, к.х.н.                |
| Ю. В. Медведев, к.фарм.н.        |                                      |

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

**Адрес редакции**

Россия, 117246, Москва,  
Научный проезд, д. 20, стр. 3  
[info@pharmjournal.ru](mailto:info@pharmjournal.ru)  
[www.pharmjournal.ru](http://www.pharmjournal.ru)

Журнал зарегистрирован в Российском  
индексе научного цитирования (РИНЦ)

Тираж 999 экземпляров

Журнал выходит один раз в квартал

Цена свободная

**Founder**

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)  
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University  
(Sechenov University)

Siberian State Medical University

**Publisher**

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

**Journal director**

N. V. Kuldjanova

**Managing Editor**

N. S. Mikhaylova

**Editorial board****Head Editor:**

I. E. Shohin, Sc.D.

[info@pharmjournal.ru](mailto:info@pharmjournal.ru)**Editors**

|                               |                                    |
|-------------------------------|------------------------------------|
| Yu. I. Ammur, PhD             | E. S. Melnikov, PhD                |
| M. V. Belousov, prof., Sc.D.  | R. I. Moustafin, PhD               |
| Bojan Calija, as. prof., PhD  | Oborotova N. A., prof., Sc.D.      |
| (Serbia)                      | V. V. Popov, prof., Sc.D.          |
| I. A. Vasilenko, prof., Sc.D. | V. L. Rusinov, RAS c.-m., Sc.D.    |
| V. V. Khutoryanskiy, prof.,   | Yu. A. Skorik, PhD                 |
| PhD (UK)                      | A. I. Slivkin, prof., Sc.D.        |
| K. S. Guzev, Sc.D.            | I. E. Smekhova, Sc.D.              |
| D. A. Gusarov, PhD            | Ya. M. Stanishevskiy, prof., Sc.D. |
| N. B. Diomina, prof., Sc.D.   | G. V. Sukoyan, Sc.D. (Georgia)     |
| S. V. Emshanova, Sc.D.        | B. B. Sysuev, as.prof., Sc.D.      |
| T. N. Komarov, PhD            | V. N. Tashlitskiy, PhD             |
| J. I. Kulnich, PhD            | O. V. Trineeva, Sc.D.              |
| O. G. Makeev, prof., Sc.D.    | V. S. Chuchalin, Sc.D.             |
| E. A. Malashenko, PhD         | N. A. Epshtein, PhD                |
| Y. V. Medvedev, PhD           |                                    |

Journal is registered in Russian index of  
scientific citation

Circulation: 999 copies

A peer-reviewed quarterly journal

Free Price

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

**Editorial office address**

20/3, Nauchniy proezd, Moscow,  
117246, Russia  
[info@pharmjournal.ru](mailto:info@pharmjournal.ru)  
[www.pharmjournal.ru](http://www.pharmjournal.ru)

## Содержание

## Contents

|                                                                                                                                                                             |          |                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>От редакции</b>                                                                                                                                                          | <b>4</b> | <b>Introduction</b>                                                                                                                                                   |
| <b>Раздел «Поиск и разработка новых лекарственных средств»</b>                                                                                                              |          | <b>«Research and development of new drug products» part</b>                                                                                                           |
| С. Я. Скачилова, Г. А. Ермакова, Н. К. Желтухин, Э. Ф. Зуева, Н. К. Давыдова                                                                                                | 7        | S. Ya. Skachilova, G. A. Ermakova, N. K. Zheltukhin, E. F. Zueva, N. K. Davydova                                                                                      |
| ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ, РАЗРАБОТАННЫЕ АО «ВНЦ БАВ» ПОД РУКОВОДСТВОМ АКАДЕМИКА М. Д. МАШКОВСКОГО (ОБЗОР)                                                                    |          | DRUGS DEVELOPED AT «ARC BASS» WITH M.D. MASHKOVSKII LEAD                                                                                                              |
| А. В. Шаталова, А. С. Якубова, В. В. Палимпсестов, И. Б. Есмагамбетов                                                                                                       | 14       | A. V. Shatalova, A. S. Yakubova, V. V. Palimpsestov, I. B. Esmagambetov                                                                                               |
| НАНОАНТИТЕЛА: СТРОЕНИЕ, ПОЛУЧЕНИЕ, ПРИМЕНЕНИЕ (ОБЗОР)                                                                                                                       |          | NANOBODIES: STRUCTURE, MANUFACTURING, APPLICATION (REVIEW)                                                                                                            |
| <b>Раздел «Фармацевтическая технология»</b>                                                                                                                                 |          | <b>«Pharmaceutical Technology» part</b>                                                                                                                               |
| Ю. И. Чистова                                                                                                                                                               | 24       | Yu. I. Chistova                                                                                                                                                       |
| ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ СБОРА ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО ТРАВЫ И ЛОПУХА БОЛЬШОГО ЛИСТА МЕТОДАМИ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ МНОГОФАКТОРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА |          | DETERMINATION OF THE OPTIMAL EXTRACTION CONDITIONS OF DANDELION HERB AND LARGE BURDOCK LEAF SPECIE BY METHODS OF MATHEMATICAL PLANNING OF A MULTIFACTORIAL EXPERIMENT |
| Н. А. Ляпунов, Е. П. Безуглая, А. Н. Ляпунов, И. А. Зинченко, Е. Ю. Брылёва, А. А. Лысокобылка                                                                              | 29       | N. A. Lyapunov, E. P. Bezuglaya, A. N. Lyapunov, I. A. Zinchenko, K. Yu. Bryleva, A. A. Lysokobilka                                                                   |
| ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ НА ЭТАПЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ                                                                                 |          | LABORATORY EQUIPMENT DURING PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT OF SEMI-SOLID PREPARATIONS                                                                                     |
| <b>Раздел «Методы анализа лекарственных средств»</b>                                                                                                                        |          | <b>«Analytical Methods» part</b>                                                                                                                                      |
| О. В. Тринеева, М. А. Рудая, А. И. Сливкин                                                                                                                                  | 38       | O. V. Trineeva, M. A. Rudaya, A. I. Slivkin                                                                                                                           |
| ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОФИЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА                                        |          | STUDY OF THE PROFILE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF FRUITS OF SEA BUCKTHOR OF DIFFERENT VARIETIES BY THE METHOD OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS                    |
| О. В. Тринеева, А. Д. Халахакун, А. И. Сливкин                                                                                                                              | 43       | O. V. Trineeva, A. J. Halahakoon, A. I. Slivkin                                                                                                                       |
| КЛЕТОЧНЫЕ НОСИТЕЛИ КАК СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР)                                                                                     |          | CELL CARRIERS AS SYSTEMS OF DELIVERY OF ANTITUMOR DRUGS (REVIEW)                                                                                                      |
| К. Б. Нгуен, А. З. Абышев                                                                                                                                                   | 59       | C. B. Nguyen, A. Z. Abyshev                                                                                                                                           |
| ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТАНЦИИ 4,4'-ДИМЕТИЛ-7,7'-ЭТИЛЕНДИОКСИ-2Н-1-ДИБЕНЗОПИРАН-2,2'-ДИОНА                                                        |          | VALIDATION METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF 4,4'-DIMETHYL-7,7'-ETHYLENDOXY-2H-1-DIBENZOPYRAN-2,2'-DIONE SUBSTANCE                                            |
| Г. М. Алексеева, В. Ф. Апраксин, Ю. Э. Генералова                                                                                                                           | 66       | G. M. Alekseeva, V. F. Apraksin, Yu. E. Generalova                                                                                                                    |
| ИЗУЧЕНИЕ КИСЛОТНО-ОСНОВНЫХ СВОЙСТВ, РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРИГИНАЛЬНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ                                    |          | EXPLORING OF ACID-BASIC PROPERTIES, DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF ORIGINAL PHARMACEUTICAL SUBSTANCE                       |
| Н. А. Дьякова, А. И. Сливкин, С. П. Гапонов                                                                                                                                 | 73       | N. A. Dyakova, A. I. Slivkin, S. P. Gaponov                                                                                                                           |
| КОНТРОЛЬ РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ И КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ НА ПРИМЕРЕ КОРНЕЙ ЛОПУХА ОБЫКНОВЕННОГО                                 |          | CONTROL OF RADIOACTIVE SAFETY AND QUALITY OF MEDICINAL VEGETABLE RAW MATERIALS OF THE GREATER BURDOCK (ARCTIUM LAPPA L.) ROOTS IN VORONEZH REGION                     |



**Раздел «Доклинические и клинические исследования»**

Д. Ю. Ивкин, П. В. Буренков, А. С. Ивкина, В. Е. Карев, Е. И. Елецкая,  
Е. Д. Семивеличенко, Г. А. Плиско

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЛАЗНЫХ КАПЕЛЬ  
ЦИТОХРОМА С ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ  
ГЛАЗ

Т. А. Сапожникова, Н. С. Макара, С. Ф. Габдрахманова,  
Р. Ю. Хисамутдинова

ИЗУЧЕНИЕ НООТРОПНОЙ И АНТИГИПОКСИЧЕСКОЙ  
АКТИВНОСТИ 5-АМИНО-ЭКЗО-3-АЗАТРИЦИКЛО[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]  
ДЕКАН-4-ОНА

**Раздел «Регуляторные вопросы»**

О. А. Лобовикова, И. В. Шульгина, Е. Г. Абрамова,  
А. К. Никифоров, А. В. Комиссаров, В. А. Демченко, А. Г. Селезнева,  
А. С. Феськова, С. С. Галетова, Н. П. Миронова

РЕГИСТРАЦИОННАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ И ИЗМЕНЕНИЯ К НЕЙ  
КАК ЭЛЕМЕНТ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА ПРИ  
ПРОИЗВОДСТВЕ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА  
(ОБЗОР)

А. М. Суханова, И. Б. Перова, Г. М. Родионова, К. И. Эллер,  
В. И. Гегечкори

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИБУТРАМИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ  
ПРЕПАРАТАХ И БАД К ПИЩЕ АНОРЕКСИГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ  
(ОБЗОР)

Н. Г. Золотарева, С. В. Стрелков, В. А. Стрелкова

ПРОГРАММА АДАПТАЦИИ И ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ  
ПЕРСОНАЛА В РАМКАХ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА  
АПТЕЧНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ (ОБЗОР)

Н. А. Эпштейн

ПРОВЕРКА ПРИГОДНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ  
СИСТЕМЫ: ВЛИЯНИЕ ПОПРАВочНЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ И  
ПОЗДНО ВЫХОДЯЩИХ ПИКОВ ПРИМЕСЕЙ НА ТРЕБОВАНИЕ К  
ОТНОШЕНИЮ СИГНАЛ/ШУМ

А. А. Крылатова, И. Е. Шохин, Е. П. Образцова

СЕРТИФИКАЦИЯ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА  
ООО «ЦЕНТР ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ АНАЛИТИКИ»  
ПО ТРЕБОВАНИЯМ СТАНДАРТА ISO 9001:2015  
(ГОСТ Р ИСО 9001-2015)

**Материалы конференций**

**«Preclinical and clinical study» part**

78 D. Yu. Ivkin, P. V. Burenkov, A. S. Ivkina, V. E. Karev, E. I. Eletskaia,  
E. D. Semivelichenko, G. A. Plisko

COMPARATIVE EFFICIENCY OF CYTOCHROME C EYE DROPS  
DURING EXPERIMENTAL EYE DAMAGE

86 T. A. Sapozhnikova, N. S. Makara, S. F. Gabdrakhmanova,  
R. Yu. Khisamutdinova

STUDY OF NOOTROPIC AND ANTI-HYPOXIC ACTIVITY  
OF 5-AMINO-3-EXO-AZATRICYCLO[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]DECAN-4-ON

**«Regulatory Issues» part**

92 O. A. Lobovikova, I. V. Shul'gina, E. G. Abramova,  
A. K. Nikiforov, A. V. Komissarov, V. A. Demchenko, A. G. Selezneva,  
A. S. Fes'kova, S. S. Galetova, N. P. Mironova

REGISTRATION DOCUMENTATION AND AMENDMENTS TO  
IT AS AN ELEMENT OF A QUALITY MANAGEMENT SYSTEM IN  
PRODUCTION OF ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULIN  
(REVIEW)

97 A. M. Sukhanova, I. B. Perova, G. M. Rodionova, K. I. Eller,  
V. I. Gegechkori

USE OF SIBUTRAMIN IN PHARMACEUTICAL DRUGS  
AND ANOREXIC DIETARY SUPPLEMENTS  
(REVIEW)

103 N. G. Zolotareva, S. V. Strelkov, V. A. Strelkova

THE PROGRAM OF ADAPTATION AND PROFESSIONAL  
DEVELOPMENT OF PERSONNEL WITHIN A QUALITY MANAGEMENT  
SYSTEM OF THE PHARMACEUTICAL ORGANIZATION (REVIEW)

108 N. A. Epshtein

CHROMATOGRAPHIC SYSTEM SUITABILITY TESTING: INFLUENCE  
OF CORRECTION FACTORS AND LATE ELUTING PEAKS  
OF IMPURITIES ON THE REQUIREMENT  
FOR THE SIGNAL-TO-NOISE RATIO

113 A. A. Krylatova, I. E. Shohin, A. S. Kardashin

CERTIFICATION OF QUALITY MANAGEMENT SYSTEM  
OF LLC «CENTER OF PHARMACEUTICAL ANALYTICS»  
ACCORDING TO THE REQUIREMENTS OF ISO 9001:2015  
(GOST R ISO 9001-2015)

**119 Conference Proceedings**

## М. Д. МАШКОВСКИЙ (вехи жизни)

1 марта 2018 г. исполнилось 110 лет со дня рождения выдающегося фармаколога, героя Социалистического Труда, лауреата Премии Совета Министров СССР, заслуженного деятеля науки РФ, доктора медицинских наук, профессора, действительного члена Российской Академии медицинских наук М. Д. Машковского. Имя Михаила Давыдовича неразрывно связано с развитием отечественной фармакологии, созданием новых лекарственных средств и его многолетней и плодотворной деятельностью во Всесоюзном научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте им. С. Орджоникидзе (ВНИХФИ, впоследствии — Центре по химии лекарственных средств, ЦХЛС–ВНИХФИ).

Высшее образование М. Д. Машковский получил во 2-м Московском государственном медицинском институте им. Н. И. Пирогова. С 1934 г. по 1938 г. он работал в научно-исследовательском институте Красной Армии, где занимался исследованиями в области физиологии, фармакологии и токсикологии. Эти исследования явились материалом его первых публикаций в «Военно-медицинском журнале».

В 1938 г. Михаил Давыдович перешел на работу во ВНИХФИ, где он трудился до последних дней своей жизни. В первые годы работы во ВНИХФИ Михаил Давыдович занимался изучением ряда алкалоидов, выделенных во ВНИХФИ из растительного сырья. В частности, им был изучен, а в последствии предложен для медицинского применения в качестве стимулятора дыхания алкалоид цитизин («цититон»). Это исследование легло в основу его кандидатской диссертации, защищенной в 1939 г. Следует отметить, что препарат цититон был защищен авторским свидетельством СССР, внедрен в производство и успешно использовался, особенно в годы Великой Отечественной Войны во фронтовых и тыловых лечебных учреждениях.

В 1941 г. в первые дни Великой Отечественной войны Михаил Давыдович ушел на фронт, где он служил сначала армейским токсикологом, а затем главным токсикологом 3-го Украинского фронта. За активное участие в Великой Отечественной

войне Михаил Давыдович был награжден орденами Красной Звезды, Отечественной Войны I и II степени и медалями.

После возвращения с фронта в 1946 г. Михаил Давыдович обобщил свои исследования в области фармакологии алкалоидов и в 1948 г. защитил докторскую диссертацию; 1950 г. ему было присвоено звание профессор по специальности «фармакология». Очень важным явилось участие М. Д. Машковского в комплексном исследовании алкалоида галантамина, впервые выделенного во ВНИХФИ из подснежника Воронова и внедренного в медицинскую практику в качестве антихолинэстеразного средства. Эта работа сохранила актуальность до сих пор, поскольку галантамин широко используется в настоящее время для лечения болезни Альцгеймера. Высокая результативность исследований, проводимых Михаилом Давыдовичем и его сотрудниками, связана прежде всего с тем, что он придавал большое значение участию в них помимо фармакологов широкого круга химиков, токсикологов, биохимиков, аналитиков, физико-химиков, фармацевтов и конечно клиницистов. Это обеспечивало не только высокую фармакологическую активность и безопасность создаваемых лекарственных средств, но и их высокое качество, определяло терапевтическую «нишу» и долгую жизнь препаратов, разработанных с его непосредственным участием.

Придавая большое значение обеспечению населения нашей страны необходимыми лекарствами, Михаил Давыдович являлся инициатором воспроизводства наиболее ценных лекарственных средств, использующихся в мировой медицинской практике: противогистаминных (димедрол, дипразин, этизин и др.), нейролептиков (аминазин, пропазин и др.), антидепрессантов (имипрамин, ипразид и др.), ноотропных (ацефен, аминалон, пирацетам) и других психотропных препаратов, анальгетиков, курареподобных препаратов (флакседил), нестероидных противовоспалительных средств (ортофен, бруфен), сердечно-сосудистых препаратов (клофелин, празозин и др.), средств для ингаляционного и неингаляционного наркоза (фторотан, кетамин, тиопентал-натрий и др.).



Фундаментальные исследования, проведенные М. Д. Машковским и его сотрудниками совместно с химиками и биохимиками привели к созданию принципиально новых групп высокоэффективных оригинальных отечественных препаратов: анальгетиков (промедол и др.), антиаллергических (противогистаминных) средств (фенкарол, бикарфен), бронхолитиков (тровентол), антидепрессантов (азафен, пиразидол, тетриндол, инказан), психостимуляторов (сиднокарб, сиднофен), холиномиметических, холиноблокирующих и спазмолитических препаратов (ацеклидин, метацин, апрофен, дипрофен) препаратов, противоязвенных средств (квидитен), ганглиоблокаторов (димеколин), синтетических курареподобных препаратов (диплацин, квалидил), -адреноблокаторов (тропафен), антиаритмических препаратов (нибенган и др.).

Одной из последних работ, выполненной Михаилом Давыдовичем и его сотрудниками, является создание первого отечественного «гибридного» адреноблокатора проксодолола, разрешенного для применения при лечении ряда сердечно-сосудистых и глазных заболеваний.

Результаты работ по созданию новых лекарственных средств широко отражены в публикациях М. Д. Машковского и его сотрудников. Им опубликовано свыше 500 статей, ряд из них в зарубежной печати; получено более 120 авторских свидетельств и патентов (в том числе зарубежных). В этих работах наряду с исследованиями, посвященными поиску и изучению фармакологически активных веществ, представлены результаты исследований механизмов действия создаваемых лекарственных препаратов, изучения зависимости биологической активности от структурных особенностей новых молекул.

Большой и результативный опыт, накопленный М. Д. Машковским, по созданию новых лекарственных средств, позволил ему изложить свое видение основных принципов направленного поиска биологически активных соединений и связанные с этим методологические проблемы, включая проблемы клинической фармакологии.

С 1954 г. систематически переиздается справочник М. Д. Машковского «Лекарственные средства» (пособие для врачей). Эта книга стала настольным руководством для многих поколений

врачей, фармацевтов и специалистов, занимающихся проблемой лекарственных средств.

Несомненной заслугой Михаила Давыдовича является воспитание большой школы фармакологов – специалистов по поиску и изучению новых лекарственных препаратов. Под его руководством защищены 11 докторских и 30 кандидатских диссертаций.

Наряду с руководством научными исследованиями М. Д. Машковский проводил большую научно-общественную работу. Свыше 30 лет он был председателем Фармакопейного и членом Фармакологического Комитетов Министерства Здравоохранения СССР и РФ, в течение 20 лет – экспертом Всемирной Организации Здравоохранения по качеству лекарственных препаратов и Международной Фармакопеи.

С первых дней существования конгресса «Человек и лекарство» Михаил Давыдович избирался почетным председателем конгресса, на заседаниях которого он неоднократно выступал с интересными докладами.

М. Д. Машковский являлся членом редколлегии ряда научных журналов, том числе и «Химико-фармацевтического журнала», на страницах которого опубликовано большое число его научных статей и обзоров. Высокий научный авторитет М. Д. Машковского признан как в нашей стране, так и за рубежом.

В 1961 г. Михаил Давыдович был избран членом-корреспондентом, а в 1978 г. – академиком Российской академии медицинских наук.

За научные заслуги М. Д. Машковский награжден орденами Октябрьской революции, Трудового Красного Знамени, Дружбы народов, Знак почета. За выдающийся вклад в развитие фармакологической науки, создание высокоэффективных лекарственных средств и подготовку научных кадров в 1991 г. ему присвоено звание Героя Социалистического Труда.

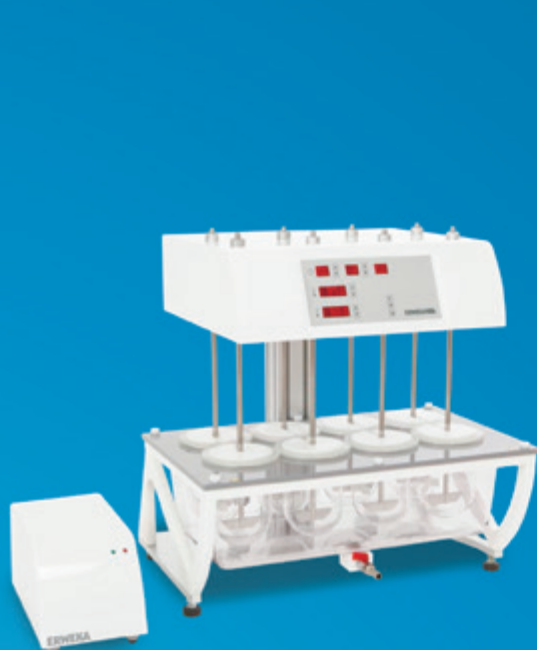
Трудно переоценить вклад Михаила Давыдовича Машковского в отечественную медицинскую науку и обеспечение населения нашей страны необходимыми лекарствами.

Имя М. Д. Машковского навсегда останется в памяти тех, кто с ним работал и его знал.

*С уважением, В.В. Чистяков  
ФГАОУ ВО «Российский университет  
дружбы народов»*

# Серия тестеров растворения ERWEKA DT light

Экономичные тестеры с ручным отбором проб

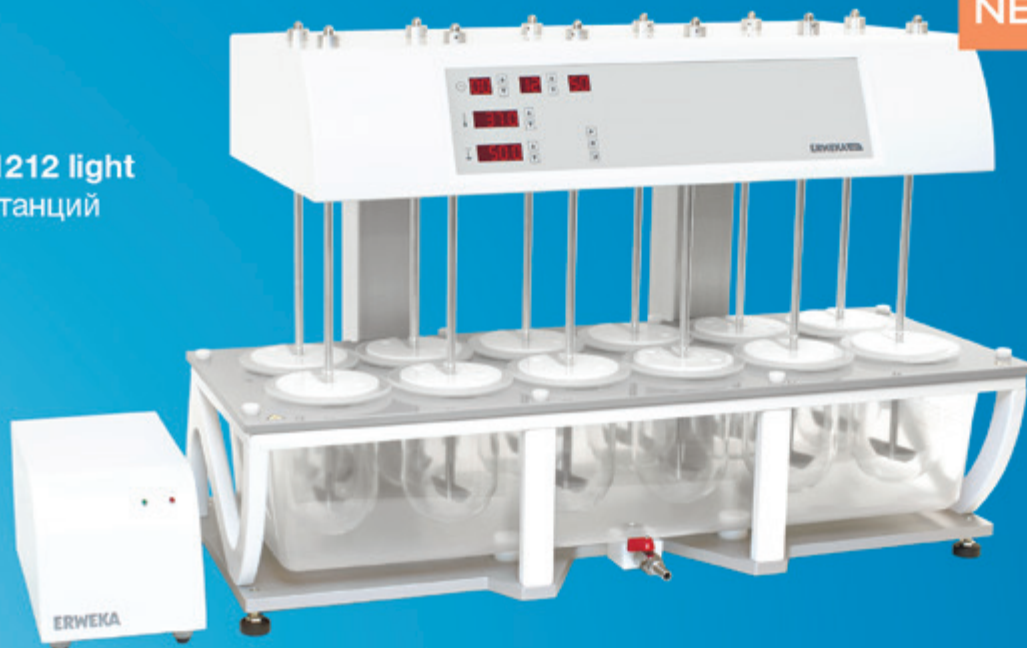


DT 128 light  
8 станций



DT 126 light  
6 станций

DT 1212 light  
12 станций





DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-7-13  
УДК 615.22:661.124; 547.831.6

## ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ, РАЗРАБОТАННЫЕ АО «ВНЦ БАВ» ПОД РУКОВОДСТВОМ АКАДЕМИКА М. Д. МАШКОВСКОГО (ОБЗОР)

С. Я. Скачилова<sup>1\*</sup>, Г. А. Ермакова<sup>1</sup>, Н. К. Желтухин<sup>1</sup>, Э. Ф. Зуева<sup>1</sup>, Н. К. Давыдова<sup>2</sup>

1 – АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ», 142450, Россия, Московская область, г. Старая Купавна, ул. Кирова, д. 23

2 – ФГБУН «Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова» Российской академии наук (ИНЭОС РАН), 119991, Россия, г. Москва, ул. Вавилова, д. 28

\*Контактное лицо: Скачилова София Яковлевна. E-mail: skachilova@mail.ru

Статья получена: 30.10.2018. Статья принята к печати: 29.12.2018

### Резюме

**Введение.** В статье представлены данные по разработке лекарственных препаратов, выполненных под руководством академика М. Д. Машковского. Приведены материалы по препаратам, относящимся к важнейшим фармакотерапевтическим группам, как дженерикам, так и оригинальным препаратам. Разработаны оригинальные методы синтеза известных препаратов-дженериков, усовершенствованная технология их получения с целью их выпуска в промышленном масштабе. Обращено внимание на обеспечение высокого качества получаемых лекарственных средств. При разработке оригинальных структур в ряду производных нитробензамида было синтезировано более 200 новых молекул. Изучены их фармакологические и токсикологические характеристики, что позволило выбрать и создать оригинальные антиаритмические препараты нибентан и ниферидил. Препараты зарегистрированы в МЗ РФ и находятся в Перечне жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств.

**Текст.** Филиал ВНИИХФИ (ныне АО «ВНЦ БАВ»), основанный в 1966 году по предложению М. Д. Машковского с целью расширения научной и экспериментальной базы по созданию лекарственных препаратов, успешно продолжает научные исследования по поиску и разработке новых лекарственных средств, включая синтез оригинальных молекул, промышленную технологию их получения, доклинические исследования фармакологической активности, лекарственной безопасности, токсикологии. В обзоре описаны оригинальные методы синтеза, по которым разработаны промышленные технологии получения фармакопейных субстанций: аминалона (гамма-аминомасляной кислоты) – одного из важнейших медиаторов нервной системы, применяемого для лечения черепно-мозговых травм и в педиатрии для улучшения обучения и памяти; дофамин – эндогенный амин, используемый в кардиохирургии, для лечения шоковых состояний различной этиологии, для лечения послеоперационных синдромов, инфаркта миокарда; высокоочищенной субстанции анальгина, которая была пригодна для приготовления инъекционных растворов; оригинальные антиаритмические препараты III класса: нибентан и ниферидил. Особое внимание было обращено на выпуск разработанных препаратов в промышленном производстве отечественных предприятий.

**Заключение.** Разработка отечественных лекарственных препаратов всегда поддерживалась М. Д. Машковским ценными предложениями, постоянным вниманием к поисковым исследованиям, к качеству лекарственных средств, выпуску их в промышленном масштабе для обеспечения здравоохранения нашей страны отечественными лекарствами.

**Ключевые слова:** оригинальный синтез, импортозамещение, химическая чистота препаратов, оригинальный препарат, промышленное производство.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Скачилова С. Я., Ермакова Г. А., Желтухин Н. К., Зуева Э. Ф., Давыдова Н. К. Лекарственные препараты, разработанные АО «ВНЦ БАВ» под руководством академика М. Д. Машковского. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 7–13.

## DRUGS DEVELOPED AT «ARC BASS» WITH M.D. MASHKOVSKII LEAD (REVIEW)

S. Ya. Skachilova<sup>1\*</sup>, G. A. Ermakova<sup>1</sup>, N. K. Zheltukhin<sup>1</sup>, E. F. Zueva<sup>1</sup>, N. K. Davydova<sup>2</sup>

1 – All-Union Research Center for Biological Active Substances Safety «ARC BASS», 23, Kirova str., Staraya Kupavna, Moscow region, 142450, Russia

2 – A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences (INEOS RAS), 28, Vavilova str., Moscow, 119991, Russia

\*Corresponding author: Sofia Ya. Skachilova. E-mail: skachilova@mail.ru

Received: 30.10.2018. Accepted: 29.12.2018

### Abstract

**Introduction.** There are presented data on drugs development with M.D. Mashkovskii lead. There are given materials on drugs belonging to important pharmacotherapeutic groups of drugs such as generic and original drugs. Original syntheses of famous generic drugs and improved industrial technologies have been developed. The attention is paid to high quality of produced drugs. More than 200 new molecules were synthesized while developing original structures of nitrobenzamide derivatives. The studies of pharmacological and toxicological characteristics have helped to choose and create original antiarrhythmic nibentan and niferidyl. The drugs are registered in the Ministry of Healthcare of the Russian Federation and included in essential drugs list.

**Text.** VNIKHFI branch called today VNC BAV founded in 1966. M.D. Mashkovskii offered that creation to expand scientific and experimental base of drugs development. It continues to research and develop new drugs including syntheses of original molecules, developing of industrial technology, and preclinical research of pharmacological activities, drug safety, and toxicology. Original synthesis schemes are described shortly in the article. Industrial technologies of pharmacopoeial substance synthesis are developed out of these schemes such as  $\gamma$ -butyric acid, dopamine, analgin for injection, and original drugs nibentan – ((RS) N-[5-(diethylamino)-1-phenylpentyl]-4-nitrobenzamide hydrochloride), niferidyl – N-1-[(4-fluorophenyl)-2-(1-ethyl-4-piperidyl)ethyl]-4-nitrobenzamide hydrochloride. The release of developed drugs to the national industrial production is specially noted.

**Conclusion.** M.D. Mashkovskii always supported national drugs development by submitting valuable offers, paying constant attention to scientific research, quality of drugs, and drugs production in industrial quantities for securing national healthcare with national drugs.

**Keywords:** original synthesis, import substitution, chemical purity, original drugs, industrial production.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Skachilova S. Ya., Ermakova G. A., Zheltukhin N. K., Zueva E. F., Davydova N.K. Drugs developed at «ARC BASS» with M. D. Mashkovskii lead. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 7–13.

## ВВЕДЕНИЕ

АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ» (ВНЦ БАВ) был создан в 1986 объединением двух институтов: филиала Всесоюзного научно-исследовательского химико-фармацевтического института (ВНИХФИ) им. С. Орджоникидзе и НИИ по биологическим испытаниям химических соединений. Филиал ВНИХФИ был основан в 1966 году по предложению М. Д. Машковского с целью расширения научной и экспериментальной базы по созданию лекарственных препаратов. Основные направления научных исследований, проводимые в филиале ВНИХФИ, практически сохранились в ВНЦ БАВ: синтез новых молекул, разработка оригинальных синтезов и промышленные технологии получения синтетических лекарственных средств, включая пожаровзрывобезопасность, промышленную токсикологию, экологию, изучение биологической активности, доклинические исследования фармакологической активности, лекарственной безопасности, токсикологии. В виварном комплексе содержатся и участвуют в экспериментах основные необходимые виды животных: кролики, крысы, мыши, морские свинки, собаки бигль.

**Текст.** М. Д. Машковский уделял огромное внимание не только созданию оригинальных отечественных препаратов, но и воспроизведению препаратов-дженериков, которые представляют собой золотой фонд мировой медицины: сульфаниламидные препараты, анальгетики пиразолонового ряда (анальгин для инъекций), препараты для лечения сердечно-сосудистых заболеваний (антиаритмики, антигипертензивные, дофамин), спазмолитики, антигистаминные препараты, ноотропы (ГАМК, пирацетам, деманол, глутаминовая кислота), ангиопротекторы (этамзилат, добезилат кальция), глюкокортикостероиды (триамцинолон, триамцинолона ацетонид, будесонид). В Министерстве медицинской промышленности СССР были разработаны специальные программы по срокам разработки и выпуска в промышленное производство этих препаратов. Филиал ВНИХФИ принимал активное участие в разработке химии, методов анализа, технологии, токсикологических и пожаровзрывоопасных исследований этих препаратов. Сотрудники филиала ВНИХФИ

участвовали во внедрении разработанных препаратов на химико-фармацевтических предприятиях.

М. Д. Машковским был предложен для разработки ряд препаратов, над которыми работали в лаборатории химии и технологии синтетических лекарственных средств филиала ВНИХФИ под его руководством.

## АМИНАЛОН

ГАМК (гамма-аминомасляная кислота) является одним из важнейших медиаторов нервной системы. В 70-е годы XX века японский препарат Gammalon на основе ГАМК был крайне популярен для лечения черепно-мозговых травм и в педиатрии для улучшения обучения и памяти. Препарат закупался в больших объемах.

Нами был разработан оригинальный синтез ГАМК (рисунок 1, 2) [1].

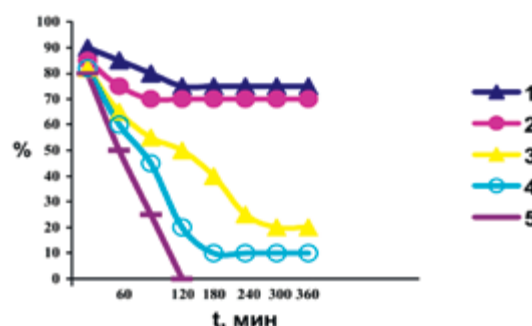


Рисунок 2. Зависимость скорости гидролиза бутиролактама от мольного отношения щелочи и лактама:

$T=90\text{ }^{\circ}\text{C}$  (1-4);  $T=100\text{ }^{\circ}\text{C}$  (5);  $B_0=3,34\text{ моль/л}$ ;  $B_0/A_0=0,3$  (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 1,5 (4); 1,1 (5)

Figure 2. The dependence of the hydrolysis rate of butyrolactam on the molar ratio of alkali and lactam:

$T=90\text{ }^{\circ}\text{C}$  (1-4);  $T=100\text{ }^{\circ}\text{C}$  (5);  $B_0=3.34\text{ mol/l}$ ;  $B_0/A_0=0.3$  (1); 0.5 (2); 1.0 (3); 1.5 (4); 1.1 (5)

В промышленности отечественный препарат аминалон на основе ГАМК долгие годы выпускался на химфармкомбинате «Акрихин». Страна отказалась от закупок японского Gammalon [2]. В настоящее время аминалон выпускает предприятие «УФАВИТА».

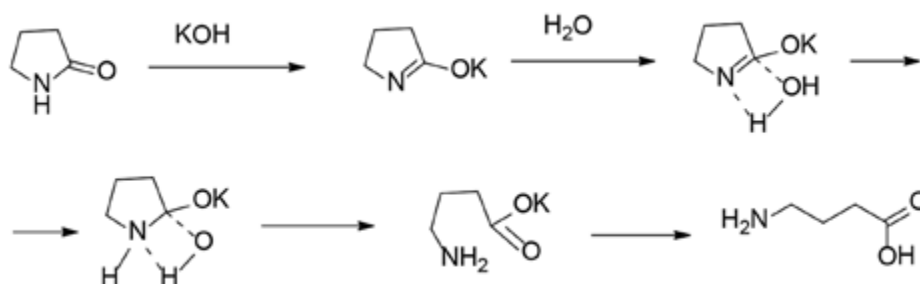


Рисунок 1. Кинетика реакции получения ГАМК

Figure 1. Kinetics of the reaction of obtaining GABA



## ДОФАМИН

Дофамин – эндогенный амин. В настоящее время дофамин имеет широкое распространение в кардиохирургии, для лечения шоковых состояний различной этиологии, для лечения послеоперационных синдромов, инфаркта миокарда. Аналогичные по действию препараты в отечественной медицинской практике в 80-е годы прошлого столетия отсутствовали. Особенность синтеза дофамина – 2-(3,4-дигидроксифенил)-этиламина – заключается в том, что вещество в виде основания крайне лабильно, сразу же после выделения из реакционной среды подвергается термо- и фотоокислительной деструкции, разлагается, полимеризуется и осмоляется. Вещество выделяют и охарактеризовывают в виде гидрохлорида или гидробромида. В качестве лекарственного препарата применяется гидрохлорид 2-(3,4-дигидроксифенил)-этиламина (рисунок 3).

Побочные продукты синтеза III, IV и V выделены и идентифицированы, разработаны методы очистки дофамина с удалением этих примесей [3–5]. Нами разработан новый каталитический способ синтеза дофамина (рисунок 4) [4, 5].

Разработанный каталитический метод деметилирования в мягких условиях позволил получать высокочистый дофамин в типовом промышленном оборудовании.

При промышленном выпуске дофамина на Ирбитском химико-фармацевтическом заводе было получено высокое качество субстанции дофамина [6].

## АНАЛЬГИН ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ

М. Д. Машковский долгие годы был председателем Фармакопейного комитета при Министерстве здравоохранения СССР и позднее РФ. Особое внимание он уделял качеству отечественных препаратов. Считал, что отечественные препараты должны быть на

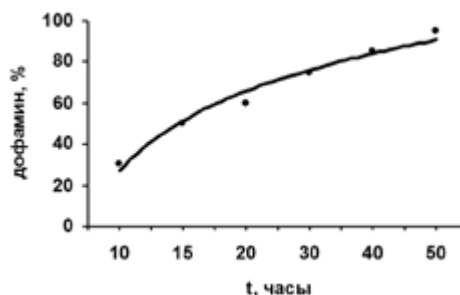


Рисунок 4. Каталитическое деметилирование

3,4-метоксифенилэтиламина при атмосферном давлении; выход дофамина 96–97%

Figure 4. Catalytic Demethylation

3,4-methoxyphenylethylamine at atmospheric pressure; dopamine yield 96–97%

уровне или даже выше по качеству, чем зарубежные препараты.

По предложению М. Д. Машковского необходимо было разработать технологию получения и новые показатели качества специальной субстанции анальгина для инъекций. Ранее выпускаемый фармакопейный анальгин содержал более 3% различных примесей, использовался как для изготовления таблеток, так и растворов для инъекций (рисунок 5) [7].

При разработке метода очистки анальгина нами впервые выделена и идентифицирована не описанная ранее примесь в субстанции анальгина, которая образуется при термоокислительной деструкции монометиламиноантипирина. Нами разработана оригинальная технология получения высокочистой субстанции анальгина, которая была пригодна для приготовления инъекционных растворов [8–10].

При разработке фармакопейной статьи на субстанцию анальгина для инъекций М. Д. Машковский предложил новые показатели качества для этой субстанции, содержание примесей — не более 0,5%. Вы-

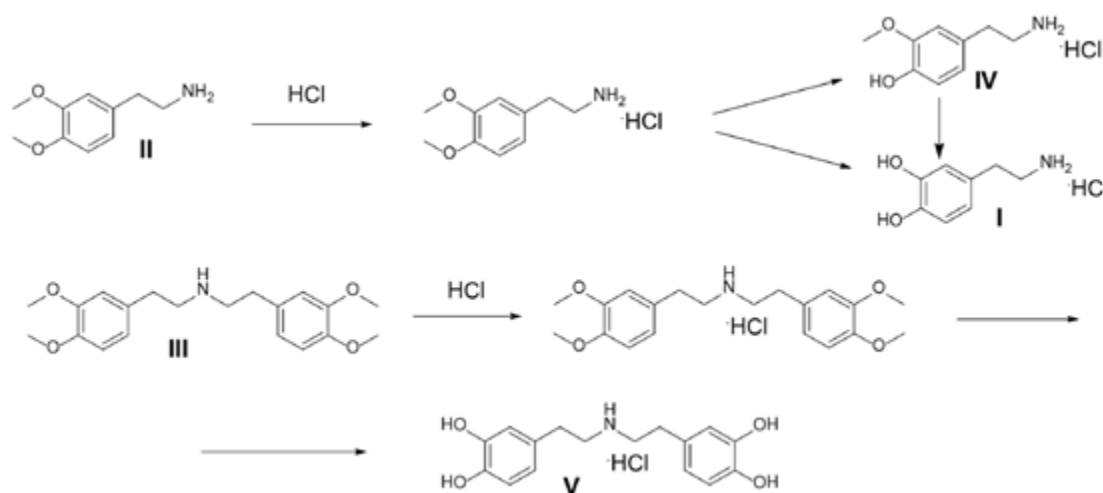


Рисунок 3. Синтез дофамина [3] и образование примесей

Figure 3. Dopamine synthesis [3] and the formation of impurities

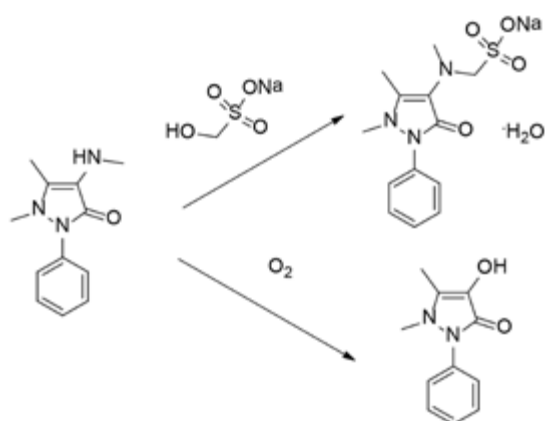


Рисунок 5. Схема синтеза анальгина и образования примеси 4-гидроксиантипирин

Figure 5. Scheme of the synthesis of dipyrone and the formation of impurities 4-hydroxyantipyrine

сокочистая субстанция анальгина для инъекций в промышленном масштабе выпускалась на Усолье-Сибирском химико-фармацевтическом комбинате [10].

## НИБЕНТАН

Одним из направлений фармакологической деятельности М. Д. Машковского являлось изучение и создание препаратов для лечения аритмий. Нами синтезировано около 200 новых оригинальных структур, которые были внимательно изучены М. Д. Машковским и его учениками. Из производных аминокетидов арилпентанового ряда изучен пирбентан, который представляет собой 5-(N-пиперидино)-1-фенил-1-бензоиламинопентана гидрохлорид. Однако, несмотря на высокую антиаритмическую активность пирбентана, он был токсичен. М. Д. Машковский активно участвовал в обсуждении новых структур и предлагал модифицировать основную активную молекулу различными фрагментами. Нами модифицирована реакция Лейкарта (восстановительное аминирование кетонов), что позволило синтезировать новые фенилгетероалкилдиаминопентаны — структурные основы в синте-

зе аминокетидов арилпентанового ряда [11, 12]. Для детальных исследований антиаритмической активности после пирбентана был выбран нибентан, предложенный М. Д. Машковским (рисунок 6) [13].

Нами было установлено, что нибентан существует в двух полиморфных модификациях [15]: одна — стабильная, с высокой температурой плавления (155–157 °C), вторая — метастабильная, низкоплавкая, с температурой плавления 98–105 °C, при нагревании переходит в стабильную модификацию. Фармакологическое изучение нибентана проведено на стабильной полиморфной модификации [16].

Полиморфные модификации нибентана различаются конформацией молекул в кристаллической структуре (рисунок 7).

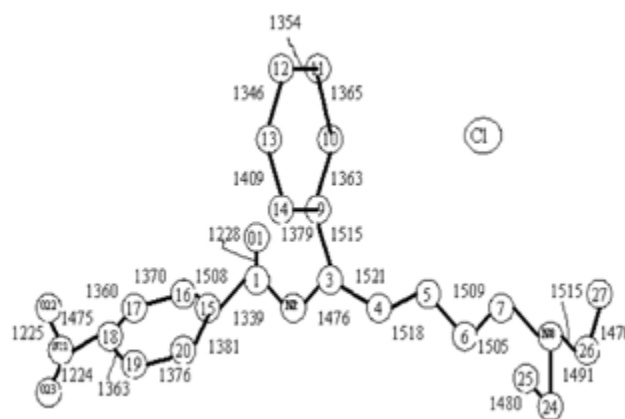


Рисунок 7. Молекулярная конформация стабильной полиморфной модификации нибентана

Figure 7. Molecular conformation of stable polymorphic modification of nibentan

По предложению М. Д. Машковского нибентан-рацемат был разделен нами на оптические энантиомеры [15].

Токсикологические и фармакологические исследования нибентана свидетельствуют, что по антиаритмической активности L-нибентан в 2 раза эффективнее

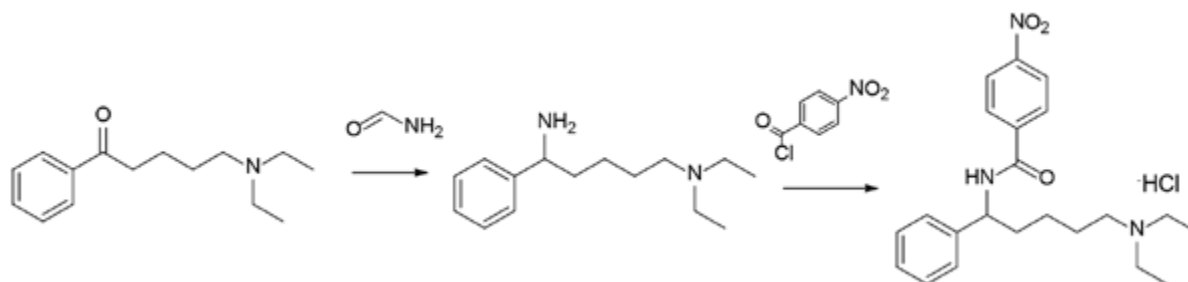


Рисунок 6. Схема синтеза нибентана

(R,S) N-[5-(диэтиламино)-1-фенилпентил]-4-нитробензамида гидрохлорида [14]

Figure 6. Synthesis of nibentan

(R,S) N-[5-(Diethylamino)-1-phenylpentyl]-4-nitrobenzamide hydrochloride [14]

D-изомера. Однако, L-изомер оказался и более токсичным, чем D-изомер.

В связи с этим для практических целей нецелесообразно разделять нибентан на энантиомеры. В медицинской практике применяют рацемат нибентана [17].

Препарат RS Нибентан™ по разработанной нами технологии выпускался отечественными предприятиями: опытно-экспериментальный завод Московского Кардиоцентра (госрегистрация № 001727/01-2002), ЗАО «Верофарм» (госрегистрация № 003356/01-2004).

Препарат нибентан был включен в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств. Создание первого отечественного антиаритмика III класса было отмечено Государственной премией [18].

## НИФЕРИДИЛ

После внедрения в производство и медицинскую практику российского антиаритмического препарата (ААП) III класса нибентана (рег. № 003356/01 от 22.04.2004) в Центре химии лекарственных средств (ЦХЛС-ВНИХФИ) был создан препарат ниферидил, впоследствии зарегистрированный под торговым названием рефралон (рег. № ЛП-002510 от 24.06.2014) [19–29].

Гидрохлорид N-1-[(4-фторфенил)-2-(1-этил-4-пиперидил)этил]-4-нитробензамида – активное действующее вещество ниферидила было выбрано для дальнейших исследований из серии новых производных 4-нитробензамида и пиперидил-4-этана как наиболее активное соединение, обладающее высокой антиаритмической активностью, длительностью действия более 240 мин. и сравнительно низкой острой токсичностью (рисунок 8) [26].

Впервые антиаритмическая активность ниферидила была выявлена в ЦХЛС-ВНИХФИ, в лаборатории академика РАМН М. Д. Машковского, где проводились углубленные фармакологические исследования препарата в сравнении с известными ААП III класса семагитилидом, D-сотололом, нибентаном, дофетелидом.

При доклиническом исследовании было установлено, что ниферидил не проявляет алергизирующих свойств (тесты общей анафилаксии – аллергический шок, реакция активной кожной анафилаксии, реакция гиперчувствительности «замедленного» типа, псевдоаллергическая реакция на конканавалин А), не обладает способностью индуцировать генные мутации, не обладает цитогенетической активностью. ЛД<sub>50</sub> у мышей при внутривенном введении составляет 39.3 мг/кг [26].

Проведенные исследования показали, что нибентан и ниферидил в дозе 0,125 мг/кг и 20 мкг/кг соответственно проявляют электрофизиологические эффекты, характерные для ААП III класса по классификации Вогана Вильямса.

Электрофизиологический механизм действия ниферидила аналогичен механизму действия нибентана и основан на подавлении выходящего калиевого тока замедленного выпрямления  $I_K$ , вследствие чего увеличивается продолжительность фазы реполяризации потенциала действия кардиомиоцитов и происходит удлинение рефрактерных периодов предсердий и желудочков сердца.

При дальнейшем клиническом изучении нибентана и ниферидила было показано, что при введении этих препаратов наблюдается увеличение:

- эффективного рефрактерного периода правого предсердия соответственно на 20,4 и 21,9%, левого предсердия – на 18,9% и 20,9%, верхушки правого желудочка – на 16 и 11%;

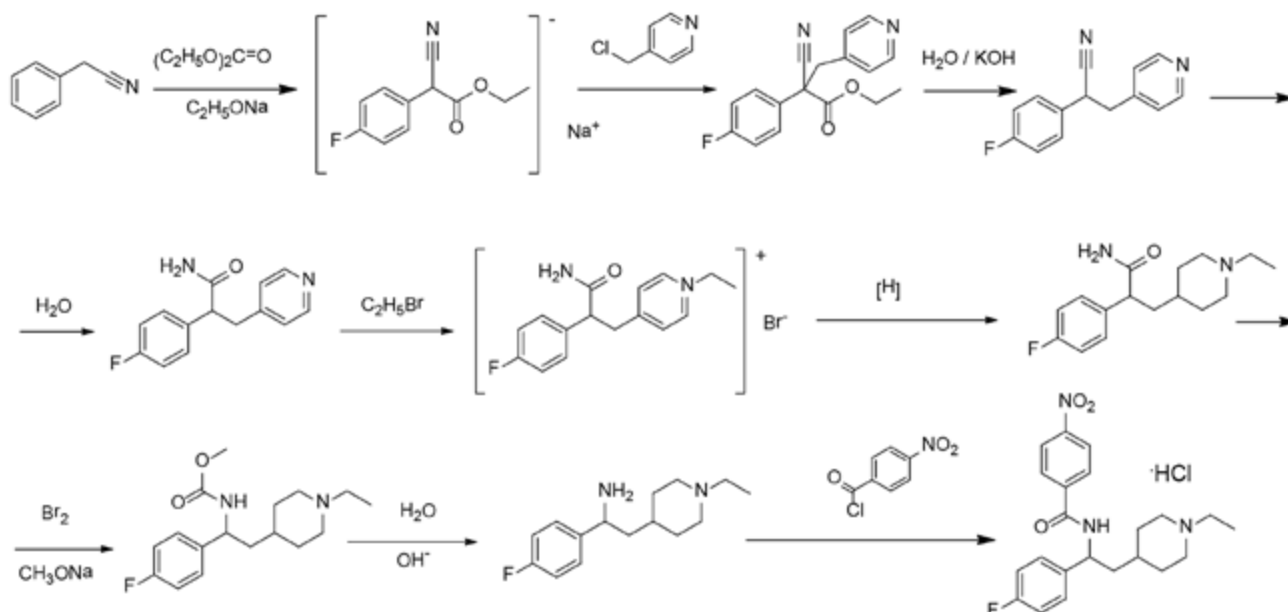


Рисунок 8. Схема синтеза Ниферидила

Figure 8. Synthesis scheme of Niferidil



- функционального рефрактерного периода специализированной проводящей системы сердца на 27,8 и 35%, и пучков Кента на 25,5 и 34,4% соответственно;
- средней продолжительности среднего сердечного цикла на 8,3 и 5,1%, соответственно, а также удлинение интервалов QT/QTc на ЭКГ на 22,4/21,9% и на 22,6/20,9%, соответственно [30].

Ниферидил восстанавливает синусовый ритм в меньших дозах (10, 20 и 30 мкг/кг), чем нибентан (0,0625 и 0,125 мг/кг). Например, эффективность медикаментозной кардиоверсии с использованием нибентана составила 67,8% при персистирующей фибрилляции предсердий (ФП) и 100% при персистирующем трепетании предсердий (ТП), тогда как ниферидил восстанавливал синусовый ритм в дозе 30 мкг/кг у 84,6% с ФП и 100% больных с ТП [30].

Нибентан и ниферидил не влияют на скорость синусового, внутри- и межпредсердного проведения, проведения по атриовентрикулярному узлу и системе Гиса-Пуркинье.

Таким образом, медикаментозная кардиоверсия с использованием ниферидила была предложена в качестве альтернативы электрической кардиоверсии при восстановлении синусового ритма у больных с персистирующей формой ФП ТП [30].

Результаты фармакологических исследований, доклинических и клинических испытаний показали, что ниферидил обладает высокой антиаритмической активностью и по основным показателям не уступает зарубежному ААП III класса дофетилиду.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

М. Д. Машковский был истинным патриотом отечественной науки. При разработке лекарственных препаратов его ценные предложения, постоянное внимание к поисковым исследованиям, к качеству получаемых лекарственных средств и интересные обсуждения при совместной разработке препаратов были основой для их создания, выпуска в промышленном масштабе и обеспечения отечественными лекарствами здравоохранения нашей страны.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Авторское свидетельство SU 452196. Способ получения гамма-аминомасляной кислоты / Скачилова С. Я., Плешаков М. Г., Кривашов А. В., Корнилов А. А. – Заявл. 12.02.1973, опубл. 12.05.1976.
2. Машковский М. Д., Плешаков М. Г., Альтшулер Р. А., Скачилова С. Я. Новый нейротропный препарат аминалон. *Химико-фармацевтический журнал*. 1975; 9: 60–62.
3. Авторское свидетельство SU 1094263. Способ получения дофамина / Глушков Р. Г., Скачилова С. Я., Зуева Э. Ф., Саяпина Ф. А. – Заявл. 15.12.1982, зарегистрировано в Госреестре 22.01.1984.
4. Авторское свидетельство SU 1098217. Способ очистки 2-(3,4-оксифенил)-этиламина гидрохлорида / Скачилова С. Я., Зуева Э. Ф., Фелицына М. И. – Заявл. 15.06.1982, зарегистрировано в Госреестре 15.02.1984.
5. Авторское свидетельство SU 1282705. Способ количественного определения 2-(3-метокси-4-оксифенил)-этиламина в дофамине / Скачилова С. Я., Дозорова И. И., Колчанова Л. А., Зуева Э. Ф. – Заявл. 23.03.1985, зарегистрировано в Госреестре 08.09.1986.
6. Машковский М. Д., Трубицина Т. К., Скачилова С. Я., Голубева М. И., Шашкина Л. Ф., Абсава Г. И. Фармакологические свойства и клиническое изучение дофамина. *Химико-фармацевтический журнал*. 1989; 8: 1018–1023.
7. Авторское свидетельство SU 882184. Способ выделения анальгина / Скачилова С. Я., Фелицына М. И., Воронин В. Г., Зуева Э. Ф., Аристов Л. И., Крюкова Ю. И., Рыжова З. А., Соколов Ю. А., Варвенко Н. Т. – Заявл. 13.04.1979, зарегистрировано в Госреестре 14.07.1981.
8. Дозорова И. И., Колоскова Л. И., Грешных Р. Д., Чичиро В. Е., Скачилова С. Я., Маркова В. А. К вопросу о повышении качества анальгина для инъекций. *Химико-фармацевтический журнал*. 1982; 10: 1236–1238.
9. Авторское свидетельство SU 823384. Способ очистки анальгина / Скачилова С. Я., Фелицына М. И., Зуева Э. Ф., Воронин В. Г., Дозорова И. И. – Заявл. 27.12.1978, опубл. 23.04.1981.
10. Авторское свидетельство SU 1011125. Способ получения раствора анальгина для инъекций / Скачилова С. Я., Маркова В. А., Зуева Э. Ф., Воронин В. Г., Пуоджюнас А. С., Дуденас Г. Э., Макаускас И. И., Дозорова И. И., Чичиро В. Е., Серафименко З. И., Грешных Р. Д., Лукошевичене Г. Р. П. – Заявл. 04.08.1981, опубл. 15.04.1983.
11. Авторское свидетельство SU 1474918. Способ получения анальгина для инъекций / Скачилова С. Я., Зуева Э. Ф., Воронин В. Г., Шамшин В. П., Мирошников Ф. Ф., Крюкова Ю. И., Варвенко Н. Т., Пыресева Е. А. – Заявл. 02.10.1986, зарегистрировано в Госреестре 22.12.1988.
12. Патент RU 1833612. Гидрохлориды 1-фенил-1-(N-нитробензоиламино)-5-(N-пиперидино) или (N-диэтиламино)пентанов, проявляющие антиаритмическую и антифибрилляторную активность / Машковский М. Д., Глушков Р. Г., Скачилова С. Я., Дородникова Е. В., Розенштраух Л. В., Воронин В. Г., Желтухин Н. К., Ануховский В. В., Нестеренко В. В., Черкасова Е. М. Патентообладатель ЦХЛС, ВНИЦ БАВ, ВКНЦ АМН СССР. – Заявл. 08.12.1987, зарегистрировано в Госреестре 13.10.1992.
13. Скачилова С. Я., Желтухин Н. К., Сергеев В. Н., Давыдова Н. К. Восстановительное аминирование стерически затрудненных ариламинокетонных с использованием модифицированной реакции Лейкарта. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018; 52(6): 44–48. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-6-44-48.
14. Авторское свидетельство SU 1249903. Способ получения 5-(N-пиперидино)-1-фенил-1-бензоиламинопентана / Глушков Р. Г., Скачилова С. Я., Желтухин Н. К., Петургова Н. П., Борисова Е. Я., Черкасова Е. М. Заявл. 20.12.1984, зарегистрировано в Госреестре 03.04.1986.
15. Авторское свидетельство SU 1822143. Гидрохлориды 1-фенил (или его замещенные)-1-(N-ациламино)-5-пиперидинопентанов, проявляющие антиаритмическую активность / Машковский М. Д., Глушков Р. Г., Дородникова Е. В., Зайцева К. А., Скачилова С. Я., Воронин В. Г., Желтухин Н. К., Черкасова Е. М. Заявл. 08.12.1987, зарегистрировано в Госреестре 12.10.1992.
16. Желтухин Н. К. Аминоамиды арилпентанового ряда. Синтез и свойства: диссертация к.хим.н. – М., 1989; 137 с.
17. Дородникова Е. В. Антиаритмические и антифибрилляторные свойства аминоамидов арилпентанового ряда: диссертация к.мед.н. – М., 1989; 143 с.
18. Машковский М. Д., Глушков Р. Г., Дородникова Е. В., Южаков С. Д. Поиск антиаритмических средств среди производных 1,5-диаминопентана. *Химико-фармацевтический журнал*. 1995; 3: 27–31.
19. Глушков Р. Г., Голицын С. П., Дородникова Е. В., Майков Е. Б., Машковский М. Д., и др. Первый оригинальный отечественный антиаритмик III класса нибентан. *Вестник РАМН*. 1998; 11: 38–41.
20. Патент RU 2059612. Способы получения гидрохлорида 1-фенил-1-п-нитробензоиламино-5-N,N-диэтиламинопентана и 1-фенил-1-амино-5-N,N-диэтиламинопентана / Глушков Р. Г., Львов А. И., Давыдова Н. К., Сизова О. С., Санжарова Г. М., Полякова М. Я., Скачилова С. Я., Желтухин Н. К., Черкасова Е. М. Патентообладатель ЦХЛС-ВНИХФИ. – Заявл. 25.02.1993. Опубл. *Бюл. "Изобретения"*. 10.05.1996; 13: 177.
21. Glushkov R. G., Mashkovski M. D., Yuzhakov S. D. Nibentan. *Drugs of the Future*. 1997; 22(1): 30–33.
22. Davydova N. K., Sizova O. S., Vinogradova, S. M., L'vov A. I., Glushkov R. G., Yuzhakov S. D., Mashkovskiy M. D. Synthesis and antifibrillatory activity of nibenentan and its analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2000; 35(2): 205–215.
23. Синтез и применение в медицине антиаритмического препарата Нибентан // Сборник тезисов докладов. С. 51–52. Научно-практическая конференция «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения». *Новый Свет*, Крым, Украина. 23–28 мая 2011 (In Ukraine).
24. Давыдова Н. К. Изучение зависимости «структура-активность» среди производных 1-фенилпентана // Сборник тезисов докладов. С. 107–108. Международная междисциплинарная научная конференция «Биологически активные вещества и материалы:

- фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. *Новый Свет*, Крым, Украина. 27 мая – 1 июня 2013 (In Ukraine).
25. Davydova N. K., Fominova O. S., Glushkov R. G. The Synthesis of Structural Analogues of the Antiarrhythmic Drug Nibentan // Abstract Book for Organic Chemistry. P. 77. 26<sup>th</sup> National Chemistry Congress. – Mugla, Turkey. 1–6 October, 2012 (In Turkey).
26. Патент RU 2415128. Гидрохлорид N-1-[(4-фторфенил)-2-(1-этил-4-пиперидил)этил]-4-нитробензамида, проявляющий антиаритмическую и антифибрилляторную активность / Глушков Р. Г., Южаков С. Д., Давыдова Н. К., Жихарева Г. П., Розенштраух Л. В., Голицын С. П., Соколов С. Ф. – Заявл. 07.05.2009, опубл. *Бюл. «Изобретения»*. 27.03.2011; 9: 1–9.
27. Глушков Р. Г., Южаков С. Д., Львов А. И., Жихарева Г. П., Давыдова Н. К., Сизова О. С., Аснина В. В., Салин Е. Н. Новая группа антиаритмических средств III класса – производных пиперидил-4-этана. *Химико-фармацевтический журнал*. 2011; 45 (2): 3–12. DOI: 10.1007/s11094-011-0562-6.
28. Давыдова Н. К., Глушков Р. Г. Создание российских антиаритмических препаратов // Сборник тезисов докладов. С. 50. *Первая Российская конференция по медицинской химии с международным участием*. – Москва, Россия. 8–12 сентября 2013.
29. Davydova N. K., Skachilova S. Ya., Sergeev V. N. Research and development of Russian class III antiarrhythmic drugs // Book of Abstracts. P. 18. 5<sup>th</sup> International Conference on Recent Advances in Health and Medical Sciences. – Paphos, Cyprus. July 6–12<sup>th</sup>, 2014.
30. Майков Е. Б. Антиаритмические препараты III класса нибентан и ниферидил: электрофизиологические эффекты, механизмы антиаритмического действия и антиаритмическая эффективность у больных с наджелудочковыми тахикардиями: автореферат диссертации д. мед. н. 14.01.05. – М., 2014; 49 с.
- Glushkov R. G., Skachilova S. Ya., Dorodnikova E. V., Rozenshtaukh L. V., Voronin V. G., Zheltukhin N. K., Anukhovskiy V. V., Nesterenko V. V., Cherkasova E. M. Patent holder TSHLS, VNTS BAV, VKNTs Academy of Medical Sciences of the USSR. – Appl. 08.12.1987, registered in the State Register on October 13, 1992 (In Russ.).
13. Skachilova S. Ya., Zheltukhin N. K., Sergeev V. N., Davydova N. K. Reductive Amination of Sterically Hindered Arylaminoketones Using a Modified Leuckart Reaction. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018; 52(6): 545–549. DOI: 10.1007/s11094-018-1857-7 (In Russ.).
14. Copyright certificate SU 1249903. The method of obtaining 5-(N-piperidino)-1-phenyl-1-benzoylaminopentane / Glushkov R. G., Skachilova S. Ya., Zheltukhin N. K., Petrugova N. P., Borisova E. Ya., Cherkasova E. M. Decl. 12.20.1984, registered in the State Register 03.04.1986 (In Russ.).
15. Copyright certificate SU 1822143. Hydrochlorides 1-phenyl (or its substituted)-1-(N-acylamino)-5-piperidinopentanes exhibiting antiarrhythmic activity / Mashkovskii M. D., Glushkov R. G., Dorodnikova E. V., Zayceva K. A., Skachilova S. Ya., Voronin V. G., Zheltukhin N. K., Cherkasova E. M. Claims 08.12.1987, registered in the State Register on 12.10.1992 (In Russ.).
16. Zheltukhin N. K. Aminoamides of arylpentane series. Synthesis and properties: PhD thesis (Chem.) – М., 1989; 137 p. (In Russ.).
17. Dorodnikova E. V. Antiarrhythmic and antifibrillatory properties of aminoamides of arylpentane series: PhD thesis (Med.) – М., 1989; 143 p. (In Russ.).
18. Mashkovskii M. D., Glushkov R. G., Dorodnikova E. V., Yuzhakov S. D. Search for antiarrhythmic drugs among 1,5-diaminopentane derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1995; 29(3): 181–185 (In Russ.).
19. Glushkov R. G., Golitsyn S. P., Golitsyn S. P., Dorodnikova E. V., Maikov E. B., Mashkovskii M. D., et al. The first original Russian class-III antiarrhythmic nibenentan. *Bulletin of RAMS*. 1998;11: 38–41. (In Russ.).
20. Patent RU 2059612. Process for the preparation of 1-phenyl-1-p-nitrobenzoylamino-5-N,N-diethylaminopentane hydrochloride and 1-phenyl-1-amino-5-N,N-diethylaminopentane / Glushkov R. G., L'vov A. I., Davydova N. K., Sizova O. S., Sanzharova G. M., Polyakova M. Ya., Skachilova S. Ya., Zheltukhin N. K., Cherkasova E. M. Patent holder Centre for Drug Chemistry, – Appl. 25.02.1993, publ. *Bul. «Inventions»*. 10.05.1996, 13:177 (In Russ.).
21. Glushkov R. G., Mashkovskii M. D., Yuzhakov S. D. Nibenentan // *Drugs of the Future*. 1997; 22(1): 30–33.
22. Davydova N. K., Sizova O. S., Vinogradova, S. M., L'vov A. I., Glushkov R. G., Yuzhakov S. D., Mashkovskiy M. D. Synthesis and antifibrillatory activity of nibenentan and its analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2000; 35(2): 205–215.
23. [Davydova N. K. Synthesis and medical application of a novel antiarrhythmic drug Nibenentan // Book of Abstracts. P. 51–52. Scientific conference «Biological active substances: Fundamental and Applied Problems». *Novy Svet*, AR Crimea, Ukraine. May 23–28, 2011 (In Ukraine).
24. Davydova N. K. A Study of the «structure-activity» relationships among the derivatives of 1-phenylpentane // Book of Abstracts. P. 107–108. International Interdisciplinary Scientific Conference «Biologically active substances and materials: fundamental and applied problems». *Novy Svet*, AR Crimea, Ukraine. May 27 – June 1, 2013 (In Ukraine).
25. Davydova N. K., Fominova O. S., Glushkov R. G. The Synthesis of Structural Analogues of the Antiarrhythmic Drug Nibenentan // Abstract Book for Organic Chemistry. P. 77. 26<sup>th</sup> National Chemistry Congress. – Mugla, Turkey. 1–6 October, 2012. (In Turkey).
26. Патент RU 2415128. N-1-[(4-фторфенил)-2-(1-этил-4-пиперидил)этил]-4-нитробензамида гидрохлорид exhibiting antiarrhythmic and antifibrillatory activity / Glushkov R. G., Yuzhakov S. D., Davydova N. K., Zhikhareva G. P., Rozenshtaukh L. V., Golitsyn S. P., Sokolov S. F. – Appl. 07.05.2009, publ. *Bul. «Inventions»*. 27.03.2011; 9: 1–9 (In Russ.).
27. Glushkov R. G., Yuzhakov S. D., L'vov A. I., Zhikhareva G. P., Davydova N. K., Sizova O. S., Asnina V. V., Salin E. N. New group of class III antiarrhythmic drugs: piperid-4-ylethane derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2011; 45 (2): 3–12. DOI: 10.1007/s11094-011-0562-6 (In Russ.).
28. Davydova N. K., Glushkov R. G. Design of Russian antiarrhythmic drugs // Book of Abstracts. P. 50. 1<sup>st</sup> Russian Conference on Medicinal Chemistry (MedChem Russia-2013). – Moscow, Russia. 8–12 September 2013 (In Russ.).
29. Davydova N. K., Skachilova S. Ya., Sergeev V. N. Research and development of Russian class III antiarrhythmic drugs // Book of Abstracts. P. 18. 5<sup>th</sup> International Conference on Recent Advances in Health and Medical Sciences. – Paphos, Cyprus. July 6–12<sup>th</sup>, 2014.
30. Майков Е. Б. Класс III антиаритмических препаратов Нибентан и Ниферидил: электрофизиологические эффекты, механизмы антиаритмического действия и антиаритмическая эффективность у пациентов с суправентрикулярными тахикардиями: abstract of DSc thesis (Med.) 14.01.05. – М., 2014; 49 p. (In Russ.).

## REFERENCES

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-14-22  
УДК 571.27

## НАНОАНТИТЕЛА: СТРОЕНИЕ, ПОЛУЧЕНИЕ, ПРИМЕНЕНИЕ (ОБЗОР)

А. В. Шаталова<sup>1\*</sup>, А. С. Якубова<sup>1</sup>, В. В. Палимпсестов<sup>2</sup>, И. Б. Есмагамбетов<sup>3</sup>

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 115093, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

2 – ФГБОУ ВО «Московский педагогический государственный университет», 119991, Россия, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 1/1

3 – ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18

\*Контактное лицо: Шаталова Анна. E-mail: shatalova.anna.v@gmail.com

Статья получена: 28.03.2018. Статья принята к печати: 18.01.2019

### Резюме

**Введение.** Однодоменные антитела (наноантитела) в отличие от классических иммуноглобулинов, представлены одним варибельным доменом тяжелоцепочечного антитела. По сравнению с классическими IgG, наноантитела обладают такими качествами, как: высокая биологическая доступность, способность взаимодействовать с труднодоступными эпитопами, высокая растворимость, термостабильность, возможность получения в бактериальных системах экспрессии.

**Текст.** Цель статьи в описании структурных и функциональных свойств наноантител, а также их эффективного применения.

**Заключение.** Области применения наноантител очень обширны: лабораторные исследования, диагностика и терапия онкологических, инфекционных, гематологических, воспалительных, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний. В зависимости от целей применения, наноантитела легко модифицировать, присоединив другое наноантитело, необходимую молекулу или радиоактивную метку. Наноантитела обладают огромным потенциалом для применения в диагностике, терапии и медицине.

**Ключевые слова:** наноантитела, однодоменные антитела, VHH.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Шаталова А. В., Якубова А. С., Палимпсестов В. В., Есмагамбетов И. Б. Наноантитела: строение, получение, применение. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 14–22.

## NANOBODIES: STRUCTURE, MANUFACTURING, APPLICATION (REVIEW)

A. V. Shatalova<sup>1\*</sup>, A. S. Yakubova<sup>1</sup>, V. V. Palimpsestov<sup>2</sup>, I. B. Esmagambetov<sup>3</sup>

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

2 – Moscow Pedagogical State University, 1/1, M. Pirogovskaya str., Moscow, 119991, Russia

3 – Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N. F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 18, Gamaleya str., Moscow, 123098, Russia

\*Corresponding author: Anna V. Shatalova. E-mail: shatalova.anna.v@gmail.com

Received: 28.03.2018. Accepted: 18.01.2019

### Abstract

**Introduction.** Single-domain antibodies (nanobodies) are composed of the heavy-chain variable domain only. Compared to conventional immunoglobulins G (IgG) nanobodies have such qualities as: high bioavailability, ability to bind epitopes that are difficult to reach, high solubility and thermal stability, etc. Nanobodies can be easily manufactured in microorganisms (*E. coli*) to significantly save on cost.

**Text.** Goal of the paper consists of the description of structural and functional properties of nanobodies and its effective application.

**Conclusion.** Nanobodies can be used in many fields of medicine and biotechnology such as research, diagnostics and therapy of oncology, infectious, hematological, inflammatory, autoimmune and neurological diseases. They can also be easily modified using another nanobody, molecules or radioactive mark as necessary. Nanobodies have huge potential for applications in diagnostics, therapy and medicine.

**Keywords:** nanobodies, single domain antibodies, VHH.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Shatalova A. V., Yakubova A. S., Palimpsestov V. V., Esmagambetov I. B. Nanobodies: structure, manufacturing, application. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 14–22.

## ВВЕДЕНИЕ

Как известно, иммуноглобулины класса G (IgG) играют большую роль в формировании иммунного ответа организма. В процессе эволюции у некоторых представителей хордовых параллельно с обычными IgG появились неканонические тяжелоцепочечные иммуноглобулины. В процессе изучения этих антител установили, что их варибельный домен может функционировать изолированно и имеет высокий биотехнологический потенциал. Такую структуру назвали однодоменным антителом или наноантителом.

На сегодняшний день, большая часть лекарств биологической природы основана на антителах. Антитела

также широко применяют в исследовательской работе и диагностике. Обычно используют моноклональные антитела, однако они имеют высокую себестоимость и могут вызывать нежелательный иммунный ответ. Альтернативой им могут стать наноантитела, обладающие такими качествами как: высокая специфичность и аффинность, высокая растворимость и стабильность.

### Общая характеристика антител

Антитела (Ig) – это белковые антигенраспознающие молекулы, вырабатываемые плазматическими клетками в ответ на проникновение в организм чужеродных антигенов [3].



Мономер антитела состоит из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых цепей (H) и двух легких цепей (L). H- и L-цепи расположены симметрично и соединены дисульфидными мостиками, локализованными ближе к С-концу легкой цепи. Тяжелые цепи в свою очередь также соединены разным количеством дисульфидных связей.

Тяжелые и легкие цепи состоят из гомологичных участков – доменов, каждый из которых состоит примерно из 110 аминокислотных остатков. В состав легкой цепи входит два домена: переменный и константный ( $V_L$ ,  $C_L$ ), а в состав тяжелой – от 4 до 5 доменов: переменный и константные ( $V_H$ ,  $C_H1$ ,  $C_H2$  и т.д.) [3]. Между  $C_H1$  и  $C_H2$  располагается небольшой участок с большим содержанием пролина – шарнирный участок. Он обладает гибкостью и способностью связывать комплемент [2] (рисунок 1).

Антигенсвязывающий участок сформирован переменными доменами легкой и тяжелой цепи. Переменные домены содержат 3 выступающих гиперпеременных участка (CDR – complementarity determining regions), а между ними находятся 4 каркасных участка (FR – framework regions). Положение гиперпеременных участков варьируется в зависимости от легкой или тяжелой цепи.

Классическое антитело имеет Fab- (fragment antigen binding) и Fc (fragment crystallizable region)-фрагменты. В состав Fab-фрагмента входят переменные последовательности ( $V_L$  и  $V_H$ ) и константные домены ( $C_L$  и  $C_H1$ ) антитела. Данный фрагмент отвечает за распознавание и связывание чужеродной молекулы антигена. В состав Fc-фрагмента входят оставшиеся константные домены. Необходимость Fc-фрагмента заключается в выполнении им таких эффекторных функций, как активация системы комплемента, антителозависимая клеточная цитотоксичность и привлечение фагоцитов [3].

В зависимости от структуры H-цепей в организме большинства млекопитающих имеется 5 классов иммуноглобулинов: IgM, IgG, IgA, IgD, IgE [3].

В иммунной защите организма участвуют все классы иммуноглобулинов, но особая роль в длительном гуморальном иммунитете против чужеродных антигенов отведена иммуноглобулинам класса G.

### Общая структура наноантител

Структура классического IgG включает в себя две тяжелых и две легких цепи, однако существуют также неканонические – тяжелопечечные антитела, лишенные легких цепей. Наличие таких антител у людей носит название болезни «тяжелых цепей», приводящей к многочисленным патологиям [39]. Однако у некоторых животных тяжелопечечные антитела функционируют наравне с классическими и играют значительную роль в иммунитете.

В 1993 году бельгийскими учеными Брюссельского свободного университета во главе с Хамерс-Кастерман было совершено важное открытие [17, 46]: в кро-

ви представителей семейства Верблюдовых (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedaries*, *Lama guanacoe*, *Lama glama*, *Vicugna vicugna*, *Vicugna pacos*) [27] наряду с классическими антителами были обнаружены антитела с упрощенной структурой [18] (рисунок 1).

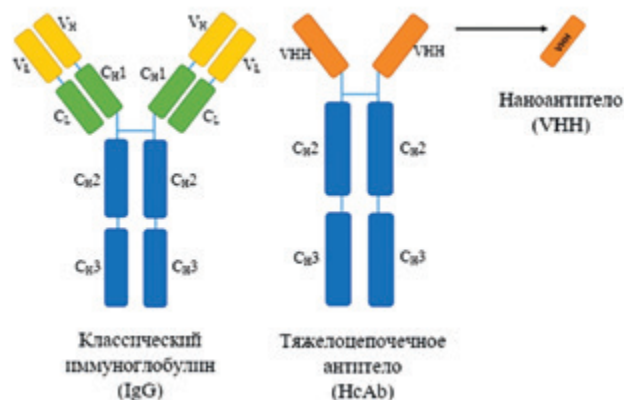


Рисунок 1. Схематическое строение классического IgG, тяжелопечечного IgG и наноантитела

Figure 1. Schematic structure of classical IgG, heavy chain IgG and nanoantibodies

Обнаруженные неканонические антитела были по своей структуре приближены к IgG, но в отличие от классического иммуноглобулина имели лишь укороченную тяжелую цепь H, состоящую из одного переменного VHN домена и двух константных доменов (VHN- $C_H2$ - $C_H3$ ). Интересно, что неканоническое антитело, несмотря на отсутствие  $V_L$ , сохраняет свою функциональность.

Появление такого феномена, как отсутствие  $C_H1$  домена в структуре тяжелой цепи IgG возможно является следствием точечной мутации в гене, кодирующей тяжелую цепь H [44].

Открытым антителам было дано название «тяжелопечечные антитела» HcAb (heavy chain-only antibodies). HcAb и классические антитела комплексно дополняют друг друга, так как неканоническая структура тяжелопечечных антител помогает им связываться с более широким спектром эпитопов [42].

Количество HcAb в сыворотке представителей Верблюдовых может варьироваться в зависимости от вида животного: у верблюдов концентрация HcAb может достигать 75%, в то время как у лам в сыворотке содержится не более чем 45% тяжелопечечных антител [8, 29, 35]. Наличие достаточно большой концентрации неканонических антител в сыворотке животных доказывает существенную роль тяжелопечечных антител в гуморальном иммунитете представителей семейства Верблюдовых.

В 1995 году Эндрю Гринберг и команда ученых обнаружили в сыворотке хрящевых рыб (*Ginglymostoma cirratum*, *Orectolobus maculatus*, *Hydrolagus barbouri*) по-

хожие тяжелоцепочечные антитела Ig-NAR [21, 38]. Эти антитела, в отличие от верблюжьих, состояли из пяти константных доменов и одного вариабельного – V-NAR [31]. Вариабельные домены тяжелоцепочечных антител хрящевых рыб (V-NAR) и представителей Верблюдовых (VHH) достигают аналогичных размеров 2,5 нм в диаметре и 4,2 нм в длину и обладают схожими свойствами.

Наличие у хрящевых рыб и Верблюдовых одноцепочечных антител по мнению ученых обусловлено конвергентной эволюцией на молекулярном уровне [32].

Вследствие относительно безопасной и легкой работы с представителями Верблюдовых в отличие от хрящевых рыб, в научном мире получило большую популярность изучение тяжелоцепочечных антител HcAb.

В течение более глубоких исследований, в сыоворотке Верблюдовых обнаружили три изотипа иммуноглобулина G: IgG1, IgG2, IgG3. В то время как IgG1 представляет собой классическое антитело массой 150 кДа, оставшиеся два изотипа имеют вид укороченных тяжелоцепочечных антител массой 90 кДа [42]. Они отличаются длиной шарнирного участка – у IgG2 он намного длиннее, чем у IgG3 и может выступать в роли C<sub>H</sub>1 домена [18, 27].

Способность VHH функционировать в отсутствии двух доменов V<sub>L</sub> и C<sub>H</sub>1 в 1997 году подтолкнула ученых к созданию методами генной инженерии первых самостоятельных рекомбинантных молекул VHH [15].

Позже биофармацевтическая компания Ablynx, акцентируя внимание на небольших размерах, дала изолированным вариабельным доменам тяжелоцепочечных верблюжьих антител коммерческое название «наноантитела» (рисунок 1) [26].

В литературе также часто встречается другое название отдельно функционирующего вариабельного домена тяжелоцепочечного антитела VHH – «однодоменное антитело».

Интерес ученых к наноантителам поддерживается до сих пор, так как они являются выгодным и эффективным инструментом в медицине, терапии и диагностике. Если сравнить между собой классические антитела и наноантитела, то можно выделить ряд преимуществ:

1. Небольшие размеры (15 кДа), способствующие проникновению в клетки и ткани.
2. Гибкость гипервариабельных участков, способствующих достижению ранее недоступных эпитопов.
3. Высокая растворимость за счет изменения аминокислотного состава.
4. Термостабильность [45].
5. Устойчивость к экстремальным pH [10].
6. Низкая иммуногенность из-за высокой гомологии VHH и VH [43].
7. Соизмеримые высокие специфичность и аффинность [45].

8. Белок кодируется одним геном длиной 380 нуклеотидных пар [21].
9. Легкая дополнительная модификация для повышения терапевтического и диагностического потенциала [41].
10. Экономически выгодное производство в бактериальных системах [34].

Перечисленные преимущества оправдывают быстрорастущий интерес к наноантителам как к перспективному средству профилактики, диагностики и лечения различных заболеваний.

### **Структурно-функциональные особенности наноантител**

По данным секвенирования генетические последовательности вариабельных участков классических антител VH и VHH похожи на 80–85% [43], но есть некоторые отличия в гипервариабельных петлях и каркасном участке FR2.

По аналогии с вариабельными доменами VH тяжелых цепей классических иммуноглобулинов G в составе VHH также выделяют 4 каркасных (FR) и 3 гипервариабельных (CDR) участка. Молекула наноантитела имеет бета-складчатую структуру: два β-листа сформированы соответственно 4 и 5 β-нитями.

Каркасные участки VH и VHH во многом похожи, но существенное отличие в аминокислотном составе второго каркасного участка (FR2) VHH способствовало образованию уникальной структуры неканоничных антител.

Вследствие замены гидрофобных аминокислот на гидрофильные или более маленькие аминокислоты [20, 24] вариабельная последовательность тяжелоцепочечных антител потеряла возможность связываться с вариабельной последовательностью легкой цепи. Данная замена в аминокислотном составе VHH способствовала появлению гомодимеров антител, обладающих более высокой растворимостью.

Однодоменные антитела, по сравнению с вариабельным доменом классических антител, также имеют существенное отличие в строении антигенсвязывающих участков. Гипервариабельные петли H1 и H3 в молекуле VHH имеют большую длину, по сравнению с классическими. Кроме того, петля H3 способна образовывать выпуклые [11], пальцеобразные расширения, которые в 60–80% отвечают за взаимодействие с конформационно недоступными для классических антител эпитопами [26, 42]. Вытянутая форма молекулы VHH и выпуклая форма паратопа привели к формированию антигенсвязывающей поверхности по размерам (600–800 Å<sup>2</sup>) почти идентичной «платформе» классических антител [28].

В свою очередь удлинение гипервариабельных участков привело к повышению пластичности молекулы VHH, нарушая прочность образующихся комплексов антиген-антитело. Как обнаружилось в дальнейших

исследованиях, для дополнительной стабилизации в составе молекулы VHH находятся дополнительные остатки цистеина, между которыми образуется дисульфидная связь. Наличие одного дисульфидного мостика и отсутствие агрегации из-за наличия гидрофильных аминокислот способствует рефолдингу молекулы, позволяя ей восстанавливать свою активность после воздействия неблагоприятных факторов (высокая температура, экстремальный pH) [19].

Исходя из вышеизложенного, можно сказать, что полезные свойства наноантител напрямую связаны с их уникальными структурно-функциональными особенностями. Из-за их свойств выгодно использовать наноантитела в широком спектре областей, что требует их наработки в промышленных масштабах. Для эффективного получения рекомбинантных молекул наноантител применяется особая технология с использованием биотехнологических методов.

### Конструирование и продукция рекомбинантных наноантител

Для получения наноантител используют тяжелоцепочечные антитела HcAb семейства Верблюдовых. Процедура включает в себя иммунизацию животного с последующим клонированием генетической последовательности VHH из клеток лимфоцитарного ряда в фагмидный вектор с целью отбора методом фагового дисплея клонов наноантител, обладающих высокой аффинностью (рисунок 2) [13, 33].

Метод фагового дисплея – это технология отбора из больших библиотек специфичных рекомбинантных белков, экспрессируемых в составе поверхностного

белка бактериофагов [1, 9]. В данном методе используется фаговый вектор M13. Весь спектр последовательностей антиген-узнающих молекул клонируется в N-конец последовательности белка оболочки бактериофага pIII в составе фагмиды [1]. Фаговая частица обычно имеет 3–5 копий белка pIII, отвечающих за инфекционную активность (N-конец) и окончание сборки фаговой частицы (C-конец). Если к N-концу присоединить белковую молекулу VHH, то функциональность белка pIII не нарушится. После трансформации фагмиды, несущей ген наноантитела, в бактерии штамма *E. coli* TG1, необходимо инфицировать бактерии фагом-помощником, содержащего необходимые гены для сборки бактериофага M13. Для повышения выхода рекомбинантных бактериофагов в технологии могут применяться различные бактериофаги-помощники. Полученные библиотеки фаговых частиц используют для трех раундов селекции с целью отбора клонов, обладающих наиболее специфичными наноантителами на поверхности белка pIII.

Сначала альпака иммунизируют целевым антигеном 5 или 6 раз с интервалом в неделю с целью индукции гуморального иммунитета и наработки классических и тяжелоцепочечных антител [23]. После последней иммунизации у животного отбирают кровь из яремной вены и из очищенных клеток лимфоцитарного ряда выделяют тотальную РНК, несущую генетическую последовательность всего разнообразия антител: классических и тяжелоцепочечных. Выделенная тотальная РНК используется для синтеза кДНК (комплементарной ДНК) методом обратной транскрипции с использованием poli-T праймеров. После получения

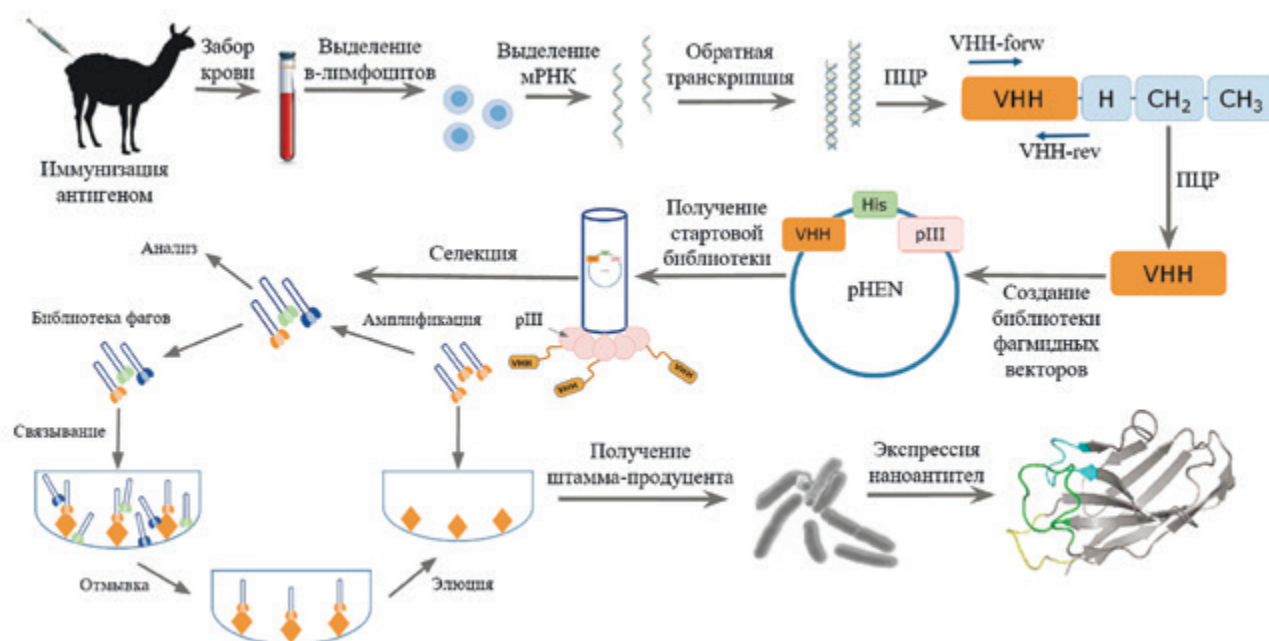


Рисунок 2. Схематическое изображение получения наноантител с применением метода фагового дисплея

Figure 2. Schematic representation of the production of nanoantibodies using the phage display method



кДНК проводится первый раунд ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих последовательность нуклеотидов, которые кодируют вариабельные домены всех изотипов IgG. Полученные ампликоны разделяют с помощью метода гель-электрофореза по молекулярной массе: 850 п.н. для амплифицированного участка  $V_H-C_H1$  классических антител и 620 п.н. для участка VHH-Hinge тяжелоцепочечных антител, у которых отсутствует  $C_H1$  домен. Затем ДНК-последовательности массой 620 п.н. элюируют из агарозного геля и на их матрице ставят второй раунд ПЦР. Во втором раунде используются специальные праймеры, фланкирующие каркасные участки (FR1 и FR4), а также содержащие некомплементарные участки матричной цепи, кодирующие сайты рестрикции [4]. По завершению двух раундов ПЦР получают нуклеотидные последовательности наноантител, имеющие с двух концов сайты рестрикции. Полученную библиотеку лигируют в фагмидные вектора [30]. В конечном итоге полученные фагмидные вектора используются в создании стартовой библиотеки бактериофагов и в трех раундах фагового дисплея для получения высокоспецифичных наноантител. Обогащение библиотеки высокоспецифичными фагами проверяют методом Поликлональный фаг ИФА (Иммуноферментный анализ). Бактериофаги, показавшие положительный результат в методе Поликлональный фаг ИФА используются для определения аминокислотной последовательности наноантител, прикрепленных к pIII белкам.

Для продукции однодоменных антител, наиболее предпочтительными являются бактериальные клетки *E. coli*, позволяющие быстро наработать продукт в больших объемах [7, 16]. Наноантитела лишены Fc-фрагмента и не нуждаются в посттрансляционных модификациях; они легко экспрессируются в периплазматическое пространство бактерий, где окислительная среда образует дисульфидные связи [36]. Так как генетическую последовательность наноантител лигируют в плазмиды, содержащие полигистидиновую последовательность, то очистку синтезированных наноантител осуществляют методом металл-аффинной хроматографии с использованием никелевых или кобальтовых сорбентов.

### Модификация и применение наноантител

На фармацевтическом рынке доля лекарств, имеющих биологическую природу, составляет свыше 20% всего объема продаж [25]. И большая часть таких препаратов представлена моноклональными антителами. Моноклональные антитела широко используют в исследованиях, диагностике и терапии заболеваний, но они характеризуются дорогостоящим производством. Кроме того, моноклональные антитела имеют большой размер (150 кДа), что ограничивает их проникновение в ткани и усложняет попадание в опухоли [37].

По сравнению с моноклональными антителами, наноантитела обладают маленьким размером (15 кДа), благодаря чему лучше проникают и равномерно распределяются в тканях организма. Однако, небольшие размеры приводят к быстрому выведению наноантител из кровотока. Для решения этой проблемы и продления периода полувыведения, наноантитела сшивают с растворимыми молекулами, например, белком плазмы крови (альбумин) [22].

В терапевтических и исследовательских целях наноантитела легко модифицировать, присоединив другое наноантитело, необходимую молекулу или радиоактивную метку. Чаще всего используют би- или трехвалентные наноантитела, обладающие большей эффективностью, чем моновалентные.

В настоящее время области применения наноантител очень обширны: лабораторные исследования, диагностика и терапия онкологических, нейродегенеративных, инфекционных, гематологических, воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

### Применение наноантител в исследованиях и диагностике

В исследованиях, для визуализации белков и клеточных процессов используют, например, хромоантитела – наноантитела с присоединенным флуоресцентным белком.

Использование наноантител в радиоизотопных методах позволяет легко, неинвазивно исследовать биологические процессы, проводить диагностику и оценивать течение заболеваний.

Наноантитела быстро и специфически связываются с мишенью, поэтому для снижения радиационной нагрузки на организм и быстрой визуализации результата используют короткоживущие радиоизотопы ( $^{68}\text{Ga}$  и  $^{18}\text{F}$ ).

В онкологии для неинвазивного доклинического скрининга и мониторинга разработаны наноантитела, специфичные к таким мишеням, как HGF (hepatocyte growth factor), CA IX (carbonic anhydrase IX), CEA (carcinoembryonic antigen), PSMA (prostate-specific membrane antigen), EGFR (epidermal growth factor receptor), гиперэкспрессия которых может свидетельствовать о наличии опухоли. Например, для скрининга некоторых видов рака молочной железы получены моновалентные наноантитела 2Rs15d, специфичные к белку-маркеру HER 2 (human epidermal growth factor receptor 2), конъюгированные с радиоактивной меткой ( $^{68}\text{Ga}$  и  $^{18}\text{F}$ ) [40].

Широкое распространение получили наноантитела в диагностике вирусных, бактериальных и грибковых инфекций. На основе наноантител разработаны чувствительные и эффективные системы ИФА, например, для обнаружения вируса гриппа штаммов H3N2 и H5N1 [41].

### **Наноантитела как системы доставки**

Наноантитела можно использовать в качестве транспортных средств для доставки лекарственных средств или токсинов к клеткам-мишеням. Направленная доставка снижает токсичность препарата для организма и повышает терапевтический эффект.

Перспективным в целевой доставке является использование наноантител в комплексе с наноразмерными носителями лекарственных средств. В качестве носителей крупных доз лекарственных средств можно использовать липосомы или мицеллы. Таким образом можно снизить частоту введения препарата и его иммуногенность, а также продлить время циркуляции комплекса в кровотоке.

Наиболее эффективным является использование более стабильных и вместилищных полимерсом. В качестве примера можно привести комплекс полимерсомы и наноантитела, специфичного к трансмембранному белку PlexinD1 сосудистой сети опухоли [12, 47].

Для направленной доставки лекарственных веществ в комплексе с наноантителами также используют внеклеточные везикулы. Они быстрее поглощаются клеткой, однако имеют короткий период полувыведения. Одним из примеров является комплекс наноантитела, специфичного к рецептору эпидермального фактора роста EGFR и внеклеточной везикулы, проинкубированный с PEG (polyethylene glycol) – мицеллами [41].

### **Противораковая терапия**

Преимущества наноантител делают их весьма перспективными в качестве диагностических и терапевтических препаратов в противораковой терапии. Небольшие размеры позволяют им легко проникать в ткани опухоли и связываться с труднодоступными эпитопами. Не смотря на низкую иммуногенность, наноантитела можно использовать лишь в качестве дополнительного препарата к основной терапии из-за отсутствия Fc-фрагмента, выполняющего эффекторные функции.

В зависимости от строения, наноантитела могут связываться с различными мишенями, и по-разному воздействовать на опухолевые клетки. Например, наноантитело, связываясь со специфическим опухолевым рецептором может контролировать рост и пролиферацию клеток, а также индуцировать апоптоз. Как пример, можно рассмотреть наноантитела к рецептору эпидермального фактора роста HER 1 (human epidermal growth factor receptor 1), успешно ингибирующие рост солидных опухолей как *in vitro*, так и *in vivo* [41].

В качестве примера, к перспективным мишеням для наноантител в противораковой терапии можно отнести активатор плазминогена урокиназного типа, играющий роль в адгезии, миграции и инвазии метастазов; хемокины, стимулирующие ангиогенез; метасто-

тический фактор карбоангидраза IX; рецептор фактора роста эндотелия сосудов VEGF-A (vascular endothelial growth factor – A). Связавшись с данными мишенями, наноантитела способны приостановить рост и миграцию опухолевых клеток [41].

Кроме того, в противораковой терапии и диагностике можно использовать модифицированные наноантитела, конъюгированные с наноразмерными носителями, содержащими лекарственные вещества; меченые радионуклидами или сшитые с наночастицами.

### **Наноантитела в адресной радионуклидной терапии и фотодинамической терапии**

Радиоиммунотерапия, сочетающая лучевую терапию с иммунотерапией, является перспективной стратегией лечения раковых заболеваний. Наноантитела, конъюгированные с радиоактивным веществом, позволяют выборочно уничтожать раковые клетки. В качестве радиоактивного вещества чаще всего используют  $\beta$ -излучающие радиоизотопы:  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ . За счет своих небольших размеров наноантитела легко проникают в опухоли, и накапливаются в них, оказывая меньшее токсическое влияние на здоровые ткани. Однако, они могут накапливаться в почках, приводя к нежелательному радиационному повреждению [40].

Фотодинамическая терапия заключается в индукции гибели клеток за счет активации фотосенсибилизатора под воздействием света. Примером могут служить наноантитела, конъюгированные с наночастицами золота. При лазерном облучении наночастицы нагреваются и повреждают раковые клетки. Такая терапия считается минимально токсичной и инвазивной [41].

### **Наноантитела для борьбы с инфекционными заболеваниями**

Терапия инфекционных заболеваний бактериальной или вирусной природы – еще одна из областей применения наноантител.

В терапии бактериальных заболеваний используют, например, наноантитела, взаимодействующие с поверхностными белками микроорганизмов, препятствуя тем самым их адгезии на клетки-мишени. Некоторые пентамеры наноантител используют для связывания со жгутиками бактерий и ограничения их подвижности.

Перспективным является конструирование наноантител, предотвращающих секрецию токсинов или факторов вирулентности бактериальных клеток [41].

При вирусных заболеваниях используют наноантитела, предотвращающие адсорбцию вируса, его проникновение и депротенинизацию. Использование мультимеризованных наноантител, специфичных к разным эпитомам, усиливает их нейтрализующее действие. Например, ALX-0171 – тривалентное наноантитело,

специфичное к поверхностному белку респираторно-синцитиального вируса. Связываясь с белком, наноантитела блокируют слияние вируса с клеткой [14].

### **Наноантитела в терапии воспалительных и аутоиммунных заболеваний**

Одним из перспективных направлений в терапии воспалительных заболеваний является использование иммуноцитоклинов. Широко известны противовоспалительные свойства некоторых цитокинов, однако свойственная им токсичность затрудняет их применение. Конъюгирование менее активных форм цитокинов с наноантителами решает эту проблему.

Другой подход в терапии воспалительных заболеваний – это регулирование функций Т-клеток. Например, было получено мультивалентное наноантитело, которое селективно связывается с ионным каналом Kv1.3 (potassium voltage-gated channel), являющимся ключевым в активации Т-клеток. В эксперименте *in vitro*, наноантитело мощно блокировало канал, стимулируя Т-клеточный ответ. Результат был подтвержден на модели крыс с гиперчувствительностью замедленного типа. Подобное наноантитело может стать перспективным лечением для ряда аутоиммунных и воспалительных заболеваний [5].

Одним из ключевых факторов воспалительного процесса является фактор некроза опухоли (ФНО). Поэтому к нему были разработаны специфичные наноантитела, выступившие в качестве эффективных супрессоров воспаления в эксперименте на мышах.

В некоторых воспалительных процессах важную роль играет интерлейкин 6 (ИЛ-6). Для регуляции этих процессов, получили бивалентные наноантитела ALX-0061, обладающие специфичностью к рецептору ИЛ-6 [6]. В данный момент препарат прошел вторую фазу клинических испытаний (clinical trial identifier: NCT02437890, 08.05.2015).

В терапии аутоиммунных заболеваний для удаления аутоиммунных иммуноглобулинов плазмаферезом используют специфичные наноантитела. Кроме того, наноантитела к иммуноглобулинам G используют в качестве лиганда при гемодиализе у пациентов с системной красной волчанкой.

В настоящее время в области лечения аутоиммунных заболеваний перспективна терапия, направленная на фактор некроза опухоли. Поэтому было разработано гуманизированное тривалентное наноантитело ATN-103, которое высокоафинно связывается с ФНО. Результаты исследований на мышиных моделях с полиартритом показали, что ATN-103 может снизить клинические проявления заболевания [41].

### **Наноантитела против гематологических заболеваний**

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура – заболевание, связанное с нарушением свертываемости крови. В настоящее время нет прове-

ренного терапевтического средства для лечения пурпуры. Компания «Ablynx» разработала каплализумаб – бивалентное моноспецифичное наноантитело, специфичное к домену A1 фактора фон Виллебранда. Каплализумаб обещает стать первым препаратом поддерживающей терапии в лечении пурпуры [41]. В 2017 году препарат прошел третью стадию клинических испытаний (Clinical trial identifier: NCT02553317, 17.09.2015).

### **Наноантитела как нейтрализующие или детоксицирующие агенты**

В медицине широко распространено применение противоядий на основе моноклональных антител. Наноантитела можно использовать в качестве эффективной дополнительной терапии для нейтрализации токсинов и ядов. Например, были получены наноантитела к ядам скорпионов (*Androctonus australis*, *Hemiscorpius lepturus*) и настоящих кобр. Другой мишенью для получения нейтрализующих наноантител являются бактериальные токсины или белки. В том числе, были получены наноантитела к липополисахаридам грамотрицательных бактерий (*Neisseria meningitidis*), холерному токсину, токсину *Clostridium Difficile*, токсину *Shigella dysenteriae*, токсину *Bacillus anthracis* и ботулотоксинам А и Е [41].

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Благодаря своей структуре и свойствам наноантитела способны эффективно связываться с ранее недоступными для классических антител антигенами, предотвращать взаимодействие рецепторов с лигандами или же доставлять к целевым клеткам вещества, выполняющие различные функции. Это обуславливает широкий спектр применения наноантител в исследованиях, диагностике и терапии различных заболеваний.

Для исследований и диагностики большим преимуществом наноантител является их экономически выгодное получение в бактериальных системах.

В терапии различных заболеваний преимуществом является их низкая иммуногенность, связанная с отсутствием Fc-фрагмента. Существенным недостатком наноантител является их быстрый период полувыведения из организма. Одним из способов решения данной проблемы является создание мультимеризованных наноантител, образующих комплексы с растворимыми белками, например, альбумином. Преимущества наноантител вызывают все больший интерес к разработке терапевтических препаратов на их основе.

На данный момент на различных стадиях клинических испытаний находятся несколько терапевтических препаратов, из которых наиболее перспективным является препарат каплализумаб. В его состав входит бивалентное наноантитело, предназначенное для терапии приобретенной тромботической тромбоцитопенической пурпуры или синдрома Мошковица. Тре-



тая стадия клинических испытаний данного препарата была завершена в сентябре 2017 года.

В данный момент ведутся исследовательские работы по изучению наноантител на базах исследовательских лабораторий, а также крупных фармацевтических фирм, таким как Sanofi и Merck.

## ЛИТЕРАТУРА

- Вятчин А. С., Тиллиб С. В. Модификации процедуры фагового дисплея для повышения эффективности селекции антигенсвязывающих доменов особых одноцепочечных верблюжьих антител. *Биотехнология*. 2008; 4: 22–27.
- Манько В. М., Девришов Д. А. Ветеринарная иммунология. Фундаментальные основы: Учебник. М: Издательство «Агровет». 2011; 752 с.
- Ярилин А. А. Иммунология: Учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2010; 752 с.
- Abbadly A. Q. et al. Evaluation of a nanobody phage display library constructed from a Brucella-immunised camel. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2011; 142: 49–56.
- Delanote V. et al. Ablynx. 2014. Challenging and intractable targets. Poster: Characterization of Anti-Kv1.3 Nanobodies and activity in Inflammatory model systems. Available at: <http://www.ablynx.com/technology-innovation/nanobodies-competitive-features/> (accessed 20.03.18).
- Ablynx. 2015. Press Releases: Ablynx Initiates Phase II SLE Study With Its Anti-IL-6R Nanobody, Partnered With Abbvie. Available at: <http://www.ablynx.com/news/press-releases/?year=2015&lang=en> (accessed 22.03.18)
- Arbabi-Ghahroudi M., Tanha J., MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev*. 2005; 24(4): 501–519.
- Blanc M.R. et al. A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type  $\gamma$ -globulins from camelid sera. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 2009; 54(4): 207–212.
- Brissett R., Neil I. Goldsteine. The use of phage display peptide libraries for basic and translational research. *Methods in Molecular Biology*. 2007; 383: 203–213.
- Chakravarty R. et al. Nanobody: The «Magic Bullet» for Molecular Imaging? *Theranostics*. 2014; 4(4): 386–398.
- De Genst E. et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2006; 103(12): 4586–4591.
- Debets M.F. et al. Nanobody-functionalized polymersomes for tumor-vessel targeting. *Macromolecular Bioscience*. 2013; 13: 938–945.
- Desmyter A. et al. Camelid nanobodies: killing two birds with one stone. *Current Opinion in Structural Biology*. 2015; 32: 1–8.
- Detalle L. et al. Generation and characterisation of ALX-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; 60: 6–13.
- Ellen R. Goldman et al. Enhancing Stability of Camelid and Shark Single Domain Antibodies: An Overview. *Front Immunol*. 2017; 8: 865.
- Estell D. et al. Adapting industry practices for the rapid, large-scale manufacture of pharmaceutical proteins. *The Bridge*. 2006; 36(3): 39–44.
- Gonzalez-Sapienza G. et al. Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications. *Front Immunol*. 2017; 8: 977.
- Hamers-Casterman C. et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993; 363: 446–448.
- Harmsen M. M., De Haard H. J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2007; 77(1): 13–22.
- Harmsen M. M. et al. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol. Immunol*. 2000; 37(10): 579–590.
- Hassanzadeh-Ghassabeh G. et al. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine (Lond)*. 2013; 8(6): 1013–1026.
- Hu Y., Liu C., Muyldermans S. Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy. *Frontiers in immunology*. 2017; 8: 1442.
- Lauwereys M., Ghahroudi M. A. et al. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J*. 1998; 17: 3512–3520.
- Maass D. R. et al. Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J. Immunol. Methods*. 2007; 324: 13–25.
- Mullard A. 2014 FDA drug approvals. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015; 14: 77–81.
- Muyldermans S. et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2009; 128: 178–183.
- Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem*. 2013. V.; 82: 17.1–17.23.
- Nguyen V. K. et al. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J*. 2000; 19(5): 921–930.
- Nguyen V. K. et al. The Specific Variable Domain of Camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline. *J. Mol. Biol*. 1998; 275(3): 413–418.
- Nguyen V. K., Desmyter A., Muyldermans S. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Adv. Immunol*. 2001; 79: 261–296.
- Nuttall S. D. et al. Isolation of a new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. *Mol. Immunol*. 2001; 38(4): 313–326.
- Oriol Sunyer J. Evolutionary and Functional Relationships of B Cells from Fish and Mammals: Insights into their Novel Roles in Phagocytosis and Presentation of Particulate Antigen. *Infect Disord Drug Targets*. 2012; 12(3): 200–212.
- Pardon E. A. et al. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat Protocols*. 2014; 9(3): 674–693.
- Pleiner T., Bates M. Nanobodies: site-specific labeling for super-resolution imaging, rapid epitope-mapping and native protein complex isolation. *Elife*. 2015; 4.
- R. van der Linden et al. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J. Immunol. Methods*. 2000; 240(1-2): 185–195.
- Rahbarizadeh F. et al. Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Immunol*. 2006; 43(5): 426–435.
- Ryman J. T., Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics and System Pharmacology*. 2017; 6(9): 576–588.
- Saerens D. et al. Antibody fragments as probe in biosensor development. *Sensors (Basel)*. 2008; 8(8): 4669–4686.
- Seligmann M. et al. Heavy chain diseases: current findings and concepts. *Immunological Rev*. 1979; 48: 145–167.
- Sharkey R. M., Goldenberg D. M. Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy*. 2011; 3: 349–370.
- Steland S. et al. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov Today*. 2016; 21(7): 1076–1113.
- Tilib S. V. «Camel Nanoantibody» is an Efficient Tool for Research, Diagnostics and Therapy. *Molecular Biology*. 2011; 45(1): 66–73.
- Van Heeke G. et al. Nanobodies as inhaled biotherapeutics for lung diseases. *Pharmacol Ther*. 2017; 169: 47–56.
- Woolven B. P. et al. The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics*. 1999; 50(1-2): 98–101.
- Yan J. et al. Characterization and applications of Nanobodies against human procalcitonin selected from a novel naïve Nanobody phage display library. *J. Nanobiotechnology*. 2015; 6: 13–33.
- Yardehnavi N. et al. A camelid antibody candidate for development of a therapeutic agent against Hemiscorpius lepturus envenomation. *Faseb J*. 2014; 28(9): 4004–4014.
- Zou T. et al. Nanobody-functionalized PEG-b-PCL polymersomes and their targeting study. *Journal of Biotechnology*. 2015; 214: 147–155.

## REFERENCES

1. Vjatchanin A. S., Tillib S. V. Modifications of the phage display procedure to increase the efficiency of selection of antigen-binding domains of specific single-chain camel antibodies. *Biotechnology*. 2008; 4: 22–27 (In Russ.).
2. Man'ko V. M., Devrishov D. A. Veterinary immunology. Fundamentals: Textbook. M: Publishing «Agrovet». 2011; 752 p. (In Russ.).
3. Yarinlin. A. A. Immunology: Textbook. M.: GEOTAR-Media. 2010; 752 p. (In Russ.).
4. Abbady A. Q. et al. Evaluation of a nanobody phage display library constructed from a Brucella-immunised camel. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2011; 142: 49–56.
5. Delanote V. et al. Ablynx. 2014. Challenging and intractable targets. Poster: Characterization of Anti-Kv1.3 Nanobodies and activity in Inflammatory model systems. Available at: <http://www.ablynx.com/technology-innovation/nanobodies-competitive-features/> (accessed 20.03.18).
6. Ablynx. 2015. Press Releases: Ablynx Initiates Phase II SLE Study With Its Anti-IL-6R Nanobody, Partnered With Abbvie. Available at: <http://www.ablynx.com/news/press-releases/?year=2015&lang=en> (accessed 22.03.18)
7. Arbabi-Ghahroudi M., Tanha J., MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev*. 2005; 24(4): 501–519.
8. Blanc M.R. et al. A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type  $\gamma$ -globulins from camelid sera. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 2009;54(4): 207–212.
9. Brissett R., Neil I. Goldsteine. The use of phage display peptide libraries for basic and translational research. *Methods in Molecular Biology*. 2007; 383: 203–213.
10. Chakravarty R. et al. Nanobody: The «Magic Bullet» for Molecular Imaging? *Theranostics*. 2014; 4(4): 386–398.
11. De Genst E. et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2006; 103(12): 4586–4591.
12. Debets M.F. et al. Nanobody-functionalized polymersomes for tumor-vessel targeting. *Macromolecular Bioscience*. 2013; 13: 938–945.
13. Desmyter A. et al. Camelid nanobodies: killing two birds with one stone. *Current Opinion in Structural Biology*. 2015; 32: 1 – 8.
14. Detalle L. et al. Generation and characterisation of ALX-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; 60: 6–13.
15. Ellen R. Goldman et al. Enhancing Stability of Camelid and Shark Single Domain Antibodies: An Overview. *Front Immunol*. 2017; 8: 865.
16. Estell D. et al. Adapting industry practices for the rapid, large-scale manufacture of pharmaceutical proteins. *The Bridge*. 2006; 36(3):39–44.
17. Gonzalez-Sapienza G. et al. Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications. *Front Immunol*. 2017; 8: 977.
18. Hamers-Casterman C. et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993; 363: 446–448.
19. Harmsen M. M., De Haard H. J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2007; 77(1): 13–22.
20. Harmsen M.M. et al. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol. Immunol*. 2000; 37(10): 579–590.
21. Hassanzadeh-Ghassabeh G. et al. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine (Lond)*. 2013; 8(6): 1013–1026.
22. Hu Y., Liu C., Muyldermans S. Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8: 1442.
23. Lauwereys M., Ghahroudi M. A. et al. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavychain antibodies. *EMBO J*. 1998; 17: 3512–3520.
24. Maass D. R. et al. Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J. Immunol. Methods*. 2007; 324: 13–25.
25. Mullard A. 2014 FDA drug approvals. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015; 14: 77–81.
26. Muyldermans S. et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2009; 128: 178–183.
27. Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu.Rev.Biochem*. 2013. V.; 82: 17.1–17.23.
28. Nguen V. K. et al. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J*. 2000; 19(5): 921–930.
29. Nguyen V. K. et al. The Specific Variable Domain of Camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline. *J. Mol. Biol*. 1998; 275(3): 413–418.
30. Nguyen V. K., Desmyter A., Muyldermans S. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Adv. Immunol*. 2001; 79: 261–296.
31. Nuttall S. D. et al. Isolation of a new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. *Mol. Immunol*. 2001; 38(4): 313–326.
32. Oriol Sunyer J. Evolutionary and Functional Relationships of B Cells from Fish and Mammals: Insights into their Novel Roles in Phagocytosis and Presentation of Particulate Antigen. *Infect Disord Drug Targets*. 2012; 12(3): 200–212.
33. Pardon E. A. et al. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat Protocols*. 2014; 9(3): 674–693.
34. Pleiner T., Bates M. Nanobodies: site-specific labeling for super-resolution imaging, rapid epitope-mapping and native protein complex isolation. *Elife*. 2015; 4.
35. R. van der Linden et al. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J. Immunol. Methods*. 2000; 240(1-2): 185–195.
36. Rahbarizadeh F. et al. Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Immunol*. 2006; 43(5): 426–435.
37. Ryman J. T., Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics and System Pharmacology*. 2017; 6(9): 576–588.
38. Saerens D. et al. Antibody fragments as probe in biosensor development. *Sensors (Basel)*. 2008; 8(8): 4669–4686.
39. Seligmann M. et al. Heavy chain diseases: current findings and concepts. *Immunological Rev*. 1979; 48: 145–167.
40. Sharkey R. M., Goldenberg D. M. Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy*. 2011; 3: 349–370.
41. Steeland S. et al. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov Today*. 2016; 21(7): 1076–1113.
42. Tilib S. V. «Camel Nanoantibody» is an Efficient Tool for Research, Diagnostics and Therapy. *Molecular Biology*. 2011; 45(1): 66–73.
43. Van Heeke G. et al. Nanobodies as inhaled biotherapeutics for lung diseases. *Pharmacol Ther*. 2017; 169: 47–56.
44. Woolven B. P. et al. The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics*. 1999; 50(1-2): 98–101.
45. Yan J. et al. Characterization and applications of Nanobodies against human procalcitonin selected from a novel naïve Nanobody phage display library. *J. Nanobiotechnology*. 2015; 6: 13–33.
46. Yardehnavi N. et al. A camelid antibody candidate for development of a therapeutic agent against Hemiscorpius lepturus envenomation. *Faseb J*. 2014; 28(9): 4004–4014.
47. Zou T. et al. Nanobody-functionalized PEG-b-PCL polymersomes and their targeting study. *Journal of Biotechnology*. 2015; 214: 147–155.



25-27 ФЕВРАЛЯ  
2019  
ГОСТИНЫЙ ДВОР  
МОСКВА

## 17-АЯ МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА **БИОТЕХПРОМ И АНАЛИТИКА**

### **РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ**

- АНАЛИТИКА
- БИОФарма
- БИОМед
- Промышленная биотехнология
- БИОЛаб
- БИОАгро
- БИОСофт
- Функциональные продукты питания
- БИОВенчур + Стартап, Кластеры и Технопарки
- Бионика
- БИОФранчайзинг
- БИОЛабДрайв

## МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС **БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ**

### **ОСНОВНЫЕ ПОТОКИ КОНГРЕССА**

- Фундаментальные исследования в биотехнологии
- Геномная инженерия
- Биотехнология и медицина
- Нанобиотехнологии в медицине
- Вакцины нового поколения
- Биофарма
- Биоинформатика
- Экология
- Сельское хозяйство
- Пищевые биотехнологии

+7 (495) 780-41-09  
+7 (495) 722-20-74  
[www.biomos.ru](http://www.biomos.ru)  
[info@biomos.ru](mailto:info@biomos.ru)



DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-24-28  
УДК 615.2./3.8.07

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ СБОРА ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО ТРАВЫ И ЛОПУХА БОЛЬШОГО ЛИСТА МЕТОДАМИ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ МНОГОФАКТОРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Ю. И. Чистова<sup>1\*</sup>

1 – ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 656015, Россия, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 40

\*Контактное лицо: Чистова Юлия Игорвна. E-mail: juls.chistova@mail.ru

Статья получена: 05.10.2018. Статья принята к печати: 11.12.2018

### Резюме

**Введение.** Получение водных извлечений из лекарственных сборов в домашних условиях влечет за собой некоторые неудобства. Поэтому актуальным является получение фитопрепаратов, в частности сухих экстрактов, из лекарственного растительного сырья. Это обеспечивает максимальный выход комплекса биологически активных веществ, а также упрощает способ его применения, дозирования и хранения. На кафедре фармации АГМУ предложен сбор состава: одуванчика лекарственного трава и лопуха большого лист (1:1). На основе этого сбора разрабатывается технология получения экстракта сухого. На выход биологически активных веществ из растительного сырья влияют различные факторы: технологические свойства сырья, способы и условия проведения процесса экстракции, применяемая аппаратура.

**Цель.** Определение оптимальных условий экстракции сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа.

**Материалы и методы.** Для решения поставленной цели использовались методы математического планирования многофакторного эксперимента: симплексный метод математического планирования, неполный факторный эксперимент типа  $2^{5-2}$ , метод крутого восхождения (метод Бокса – Уилсона) по поверхности отклика. Исходя из теоретических основ экстракции, выбраны параметр и факторы оптимизации процесса, указаны интервалы их варьирования. Переменными факторами явились измельченность, соотношение «сырье : экстрагент», время мацерации, температура и число мацераций. Экстракцию проводили методом ремацерации, экстрагентом служила вода очищенная, поскольку данным растворителем извлекается максимальное количество экстрактивных веществ сбора. Параметром оптимизации служило истощение сбора по экстрактивным веществам, извлекаемым водой.

**Результаты и обсуждение.** В результате симплексного метода проведен ряд исследований до достижения области предполагаемого оптимума. Неполный факторный эксперимент типа  $2^{5-2}$  использовали для описания эксперимента в области предполагаемого оптимума и составления уравнения поверхности отклика. Получено линейное уравнение экстракционного процесса и доказана адекватность работы полученной математической модели. Для уточнения условий и установления оптимального режима экстракции использовали метод крутого восхождения по поверхности отклика.

**Заключение.** Определены оптимальные условия экстракции сбора: измельченность – 2 мм, соотношение «сырье : экстрагент» – 1:10, время мацерации – 30 минут, число мацераций – 3, температура – 100 °С. Данные результаты будут использоваться в разработке технологии и технологической схемы получения экстракта сбора сухого.

**Ключевые слова:** экстракт, одуванчик лекарственный, лопух большой, планирование эксперимента, технология, математическое планирование, оптимальные параметры экстракции, экстракция.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Чистова Ю. И. Определение оптимальных условий экстракции сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа методами математического планирования многофакторного эксперимента. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 24–28.

## DETERMINATION OF THE OPTIMAL EXTRACTION CONDITIONS OF DANDELION HERB AND LARGE BURDOCK LEAF SPECIE BY METHODS OF MATHEMATICAL PLANNING OF A MULTIFACTORIAL EXPERIMENT

Yu. I. Chistova<sup>1\*</sup>

1 – Altay State Medical University, 40, Lenina str., Barnaul, 656015, Russia

\*Corresponding author: Yulia I. Chistova. E-mail: juls.chistova@mail.ru

Received: 05.10.2018. Accepted: 11.12.2018

### Abstract

**Introduction.** Use of medicinal species at home entails some inconvenience. Therefore, it is topical to obtain phytopreparations, in particular dry extracts, from medicinal plant raw materials. This ensures the maximum yield of a complex of biologically active substances, and simplifies the way of its application, dosing and storage. The department of pharmacy of the Altai State Medical University has developed a specie of the following composition: dandelion medicinal herb and large burdock leaf (1:1). On the basis of this species, a technology for obtaining the dry extract is being developed. Variety factors influence on the output of a complex of biologically active substances from plant raw materials: the technological properties of raw materials, the methods and conditions for carrying out the extraction process, and the equipment used.

**Aim.** To determine the optimal conditions for extracting a specie of dandelion herb and a large burdock leaf.

**Materials and methods.** To solve this problem, methods of mathematical planning of a multifactorial experiment have been used: simplex method of mathematical planning, incomplete factorial experiment of type  $2^{5-2}$  for compiling the equation of the response surface, the method of steep ascent (the Box – Wilson method) along the response surface. Based on the theoretical basis of extraction, parameters and factors of process optimization were chosen, intervals of their variation are indicated. Variable factors – shredding, the ratio of «raw materials : extractant», time of maceration, temperature and the number of maceration. The extraction was carried out by remaceration, aqua purificata serves as extractant. The parameter of optimization was the exhaustion of the specie of extractive substances.

**Results and discussion.** As a result of the simplex method, a number of studies were carried out until the area of the supposed optimum was reached. To describe the experiment in the region of the optimum and to compose the equation of the response surface, an incomplete factor experiment of the type  $2^{5-2}$  were put. A linear equation of the extraction process were obtained and the adequacy of the work of the obtained mathematical model is proved. To refine the extraction conditions and establish the optimal extraction regime, the method of steep ascent on the response surface was used.

**Conclusion.** As a result of the experiment, optimal extraction conditions were established: crushing – 2 mm, ratio «raw material : extractant» – 1:10, time of maceration – 30 minutes, number of maceration – 3, temperature – 100 °C. These results will be used in the development of technology and the technological scheme for obtaining the dry extract of the specie.

**Keywords:** extract, dandelion, burdock, planning of experiment, technology, mathematical planning, optimal extraction parameters, extraction.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Chistova Yu. I. Determination of optimal conditions for the collection of dandelion and burdock of a large leaf extraction methods of mathematical planning of the experiment. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 24–28.

## ВВЕДЕНИЕ

Применение лекарственных растений, в том числе и сборов, в медицине обусловлено наличием в них комплекса биологически активных соединений. Лекарственное сырье, обладая сродством действующих веществ к организму человека, практически не имеет побочных эффектов. Применение сборов в домашних условиях влечет за собой некоторые неудобства: ограниченный срок годности настоев и отваров, а также сложность в дозировании. Поэтому актуальным является получение фитопрепаратов из лекарственного сырья. Получение экстрактов сухих на основе лекарственных сборов обеспечивает максимальный выход комплекса биологических веществ, а также улучшает способ его применения, дозирования и хранения [1–5].

На кафедре фармации АГМУ предложен сбор состава: одуванчика лекарственного трава и лопуха большого лист [6]. Нами разрабатывается технология получения экстракта сухого на основе сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа. Необходимо подобрать оптимальные условия экстракции.

Как известно, экстрагирование растительного сырья – сложный процесс. На экстрагирование влияют различные факторы, в том числе технологические свойства сырья, способы и условия проведения процесса экстракции, применяемая аппаратура. На процесс экстракции влияют следующие условия: размер частиц сбора, соотношение «сырье : экстрагент», температура настаивания, время настаивания, число мацераций, характер экстрагента. Изменяя условия экстракции, можно регулировать данный процесс и влиять на выход биологически активных веществ [7–10].

При поиске оптимальных условий экстракции используют различные методы математического планирования многофакторного эксперимента, которые нашли широкое применение в фармации как в отечественных работах, так и за рубежом. Это позволяет сократить количество экспериментов за счет оптимизации хода исследования, минимизации количества опытов [9, 11–17].

Учитывая теоретические основы экстрагирования лекарственного растительного сырья (сбора) и результаты определения экстрактивных веществ сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа, были выбраны исходные данные экстракционного процесса [6, 18, 19].

**Цель работы** – установление оптимальных условий экстракции сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа с использованием математического планирования многофакторного эксперимента.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся сбор одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа (1:1).

Для поиска оптимальных условий экстракции сбора с целью максимального извлечения экстрактивных веществ был применен симплексный метод математического планирования. Неполный факторный эксперимент использовали для описания эксперимента в области предполагаемого оптимума. Установление оптимального режима и уточнение условий экстракции биологически активных соединений проводили с помощью метода Бокса – Уилсона с использованием линейного уравнения экстракционного процесса [20].

Ранее установлено, что максимальное количество экстрактивных веществ сбора извлекается водой очищенной (35,46%) [21]. Таким образом, экстракцию проводили методом ремацерации, в качестве экстрагента использовали воду очищенную.

В качестве параметра оптимизации являлось истощение сбора по экстрактивным веществам, извлекаемым водой. Определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводили по методике ОФС.1.5.3.0006.15 «Определения содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» Государственной Фармакопеей XIII издания [22].

Использовали в эксперименте реактивы: вода очищенная (ФС.2.2.0020.15).

В соответствии с теоретическими основами экстракции были выбраны следующие переменные факторы:  $x_1$  – измельченность сбора;  $x_2$  – соотношение сырья и экстрагента;  $x_3$  – время одного настаивания;  $x_4$  – число мацераций;  $x_5$  – температура экстрагента.

Используя симплексный метод, был построен план эксперимента (симплекс-план). Для его построения определяли основной уровень ( $a_i$ ) для каждого фактора ( $x_i$ ) и интервал варьирования ( $c_i$ ) (таблица 1).

**Таблица 1. Исходные уровни переменных факторов экстракционного процесса**

**Table 1. Initial levels of variables extraction process**

| Фактор                                    | Уровни варьирования |                 |         | Интервал варьирования, $c_i$ |
|-------------------------------------------|---------------------|-----------------|---------|------------------------------|
|                                           | нижний              | основной, $a_i$ | верхний |                              |
| Измельченность сбора ( $x_1$ ), мм        | 0,5                 | 2,0             | 3,5     | 1,5                          |
| Соотношение сырья и экстрагента ( $x_2$ ) | 1:5                 | 1:10            | 1:15    | 5                            |
| Время одного настаивания ( $x_3$ ), мин   | 15                  | 30              | 45      | 15                           |
| Число мацераций ( $x_4$ )                 | 2                   | 3               | 4       | 1                            |
| Температура ( $x_5$ ), °C                 | 20                  | 60              | 100     | 40                           |

Далее рассчитывали кодовые значения переменных факторов ( $x_i$ ) по формулам (1) и (2):

$$r_k = \frac{1}{\sqrt{2k \cdot (k+1)}}, \quad (1)$$

$$R_k = k \cdot r_k, \quad (2)$$

где  $r_k$  – радиус вписанной сферы,  $R_k$  – радиус описанной сферы около правильного симплекса.

Переход от кодовых значений, представленных в таблице 2, к натуральным осуществляли по формуле (3):

$$x_i = a_i + c_i \cdot x_i, \quad (3)$$

где  $a_i$  – основной уровень варьирования переменного фактора,  $c_i$  – интервал варьирования переменного фактора,  $x_i$  – переменный фактор.

Таблица 2. Кодовые значения переменных факторов

Table 2. Code values of variable factors

| Опыт | Переменные факторы |        |        |        |        |
|------|--------------------|--------|--------|--------|--------|
|      | $x_1$              | $x_2$  | $x_3$  | $x_4$  | $x_5$  |
| 1    | -0,5               | -0,289 | -0,204 | -0,158 | -0,129 |
| 2    | 0,5                | -0,289 | -0,204 | -0,158 | -0,129 |
| 3    | 0                  | 0,578  | -0,204 | -0,158 | -0,129 |
| 4    | 0                  | 0      | 0,612  | -0,158 | -0,129 |
| 5    | 0                  | 0      | 0      | 0,632  | -0,129 |
| 6    | 0                  | 0      | 0      | 0      | 0,645  |

Полученные натуральные значения факторов использовали для постановки опытов в вершинах симплекса. В конце каждого опыта сравнивали полученные результаты, точку с худшим показателем отбрасывали. Новую вершину симплекса-плана формировали присоединением к оставшимся вершинам новой. Таким образом, осуществляли движение к оптимальной области. Значение  $k$ -факторов для новой вершины рассчитывали по формуле (4):

$$x_{i,n} = \frac{2}{k} \left( \sum_{j=1}^{k+1} x_{i,j} - x_{i,отбр.} \right) - x_{i,отбр.}, \quad (4)$$

где  $\sum_{j=1}^{k+1} x_{i,j}$  – сумма всех значений факторов  $x_i$ ;  $x_{i,n}$  – новое значение фактора  $x_i$ ;  $x_{i,отбр.}$  – отброшенное значение фактора  $x_i$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Используя данные полученных переменных факторов, была составлена рабочая матрица симплекса-плана (таблица 3).

Таблица 3. Рабочая матрица симплекса-плана

Table 3. The working matrix of the simplex plan

| Симплекс                           | Вершина симплекса | Переменные факторы |           |           |          |           | Параметр оптимизации, у% |
|------------------------------------|-------------------|--------------------|-----------|-----------|----------|-----------|--------------------------|
|                                    |                   | $x_1$              | $x_2$     | $x_3$     | $x_4$    | $x_5$     |                          |
| $S_0$                              | 1                 | 1                  | 9         | 27        | 3        | 55        | 72,9                     |
|                                    | 2                 | 3                  | 9         | 27        | 3        | 55        | 80,5                     |
|                                    | 3                 | 2                  | 13        | 27        | 3        | 55        | 84,2                     |
|                                    | 4                 | 2                  | 10        | 39        | 3        | 55        | 75,4                     |
|                                    | 5                 | 2                  | 10        | 30        | 4        | 55        | 90,5                     |
|                                    | 6                 | 2                  | 10        | 30        | 3        | 86        | 82,2                     |
| $S_1(2,3,4,5,6)$                   | 7                 | 3                  | 12        | 34        | 3        | 67        | 86,5                     |
| $S_2(2,3,5,6,7)$                   | 8                 | 3                  | 12        | 20        | 3        | 72        | 91,6                     |
| $S_3(3,5,6,7,8)$                   | 9                 | 2                  | 14        | 29        | 3        | 79        | 89,7                     |
| <b><math>S_4(3,5,7,8,9)</math></b> | <b>10</b>         | <b>3</b>           | <b>14</b> | <b>26</b> | <b>3</b> | <b>89</b> | <b>96,3</b>              |
| $S_5(5,7,8,9,10)$                  | 11                | 3                  | 12        | 29        | 3        | 90        | 90,3                     |
| $S_6(5,8,9,10,11)$                 | 12                | 2                  | 13        | 20        | 3        | 87        | 89,8                     |
| $S_7(5,8,10,11,12)$                | 13                | 3                  | 10        | 21        | 3        | 79        | 80,0                     |

Каждую вершину симплекса-плана реализовывали по единой схеме. Например, для симплекса  $S_0$  (вершина 1) эксперимент проводили следующим образом: 10,0 г сбора (с точностью до 0,01) с размером частиц 1 мм помещали в плоскодонную колбу и заливали 116 мл (коэффициент водопоглощения сбора  $K=2,62$ ) воды очищенной нагретой до 55 °С, настаивание проводили в течении 27 мин. По окончании времени извлечение сливали, процесс настаивания повторяли еще 2 раза при тех же условиях. Все сливы объединяли и присоединяли отжим из шрота. Полученное извлечение отфильтровывали через слой марли или бязи и проводили определение содержания экстрактивных веществ, которое составило 25,85%, что по отношению к исходному уровню в сборе составляет – 72,9%. Определение повторяли пять раз. Далее проводили определение для всех 13 вершин симплекса-плана.

В результате была найдена вершина 10, которая лежит в области предполагаемого оптимума, со следующими значениями переменных факторов:  $x_1=3$ ,  $x_2=14$ ,  $x_3=26$ ,  $x_4=3$ ,  $x_5=89$  (таблица 3).

Для изучения окрестности полученных лучших по сравнению с другими условиями было решено поставить неполный факторный эксперимент типа  $2^{5-2}$  для составления линейного уравнения регрессии. Первый опыт проводили соответственно при следующих условиях:  $x_1=2$ ,  $x_2=11$ ,  $x_3=25$ ,  $x_4=4$ ,  $x_5=100$ . Выход экстрактивных веществ составил 87,5%. Реализацию последующих опытов осуществляли согласно с матрицей неполного факторного эксперимента по схеме, приведенной выше. В каждой точке плана опыт осуществляли в пяти повторностях. В таблице 4 приведены средние значения параметров оптимизации.



Таблица 4. Матрица плана неполного факторного эксперимента типа 2<sup>5-2</sup>

Table 4. Matrix of the plan of incomplete factorial experiment of type 2<sup>5-2</sup>

| Опыт                                  | Переменные факторы |                |                |                |                | Параметр оптимизации    |                         |
|---------------------------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------------|-------------------------|
|                                       | x <sub>1</sub>     | x <sub>2</sub> | x <sub>3</sub> | x <sub>4</sub> | x <sub>5</sub> | y <sub>экспер</sub> , % | y <sub>расчет</sub> , % |
| Основной уровень, a <sub>i</sub>      | 3                  | 14             | 30             | 3              | 90             |                         |                         |
| Интервал варьирования, c <sub>i</sub> | 1                  | 3              | 5              | 1              | 10             |                         |                         |
| Опыт 1                                | –                  | –              | –              | +              | –              | 87,5                    | 90,0                    |
| 2                                     | –                  | +              | –              | –              | +              | 85,0                    | 87,1                    |
| 3                                     | +                  | –              | –              | –              | +              | 85,4                    | 85,7                    |
| 4                                     | +                  | +              | –              | +              | –              | 89,1                    | 89,1                    |
| 5                                     | –                  | –              | +              | +              | +              | 95,2                    | 92,7                    |
| 6                                     | –                  | +              | +              | –              | –              | 83,6                    | 81,5                    |
| 7                                     | +                  | –              | +              | –              | –              | 80,5                    | 80,1                    |
| 8                                     | +                  | +              | +              | +              | +              | 91,8                    | 91,8                    |

По результатам опытов рассчитаны коэффициенты регрессии и получено уравнение экстракционно-го процесса (5), которое позволило рассчитать y<sub>расчетное</sub> (таблица 4).

$$y = 87,25 - 0,57x_1 + 0,11x_2 - 0,72x_3 + 3,64x_4 + 2,08x_5. \quad (5)$$

По t-критерию Стьюдента (при P=0,95) определены незначимые коэффициенты уравнения регрессии, которые заменены нулями, и получено уравнение следующего вида:

$$y = 87,25 + 3,64x_4 + 2,08x_5. \quad (6)$$

Полученное уравнение адекватно результатам эксперимента, так как вычисленный F-критерий Фишера (F=0,6) меньше табличного F<sub>0,05</sub>(4,16)=3,01.

Согласно данным уравнениям (5), (6) можно судить о влиянии каждого переменного фактора на выход экстрактивных веществ из сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа (1:1).

В ходе дальнейших исследований с помощью метода крутого восхождения (метод Бокса – Уилсона) конкретизированы условия экстракции, установлен оптимальный режим экстракции. Этот метод позволяет минимизировать затраты времени и числа опытов для достижения поставленной цели.

Исходя из результатов вышеописанных исследований удалось установить основные уровни, интервалы варьирования и коэффициенты регрессии факторов, значимо влияющих на процесс экстракции. Благодаря этому, представилось возможным рассчитать шаг  $h=c_i \cdot b_i / 4$ , а затем и условия проведенных мысленных опытов. Шаговое движение по поверхности отклика позволяет в небольшом количестве опытов определить оптимальную область. Данные представлены в таблице 5.

Таблица 5. Крутое восхождение по поверхности отклика

Table 5. Steep ascent of the response surface

| Характеристики                                   | x <sub>4</sub> | x <sub>5</sub> | y, % |
|--------------------------------------------------|----------------|----------------|------|
| Основной уровень, a <sub>i</sub>                 | 4              | 100            |      |
| Интервал варьирования, c <sub>i</sub>            | 1              | 10             |      |
| Коэффициент, b <sub>i</sub>                      | +3,64          | +2,08          |      |
| c <sub>i</sub> · b <sub>i</sub>                  | +3,64          | +20,8          |      |
| Расчет шага, h=c <sub>i</sub> ·b <sub>i</sub> /4 | +0,91          | +5,2           |      |
| Шаг, h                                           | +1             | +5             |      |
| Мысленные опыты 1                                | 3              | 100            | 95,7 |
| 2                                                | 2              | 100            | 93,2 |
| 3                                                | 1              | 100            | –    |

Из рассчитанных мысленных опытов воспроизведен первый при x<sub>1</sub>=2, x<sub>2</sub>=10, x<sub>3</sub>=30, x<sub>4</sub>=3, x<sub>5</sub>=100. Выход экстрактивных веществ составил 95,7%. При реализации второго мысленного опыта выход по экстрактивным веществам составил 93,2%. Уменьшение числа экстракций приводит к снижению выхода экстрактивных веществ из сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа, поэтому проведение третьего мысленного опыта не имело смысла. Большая величина и положительный знак у коэффициента x<sub>4</sub> в уравнении регрессии позволяют заключить, что число мацераций влияет на количество экстрактивных веществ, извлекаемых из сбора. Поэтому был поставлен четвертый мысленный опыт, где значение x<sub>4</sub>=4, выход по экстрактивным веществам составил – 92,6%. Это позволило считать эксперимент законченным.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате использования методов математического планирования эксперимента установлены оптимальные условия экстракции сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа: измельченность – 2 мм, соотношение «сырье : экстрагент» – 1:10, время мацерации – 30 мин, число мацераций – 3, температура – 100 °С. Данные результаты будут использоваться для разработки технологии и технологической схемы производства сухого экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа.

## ЛИТЕРАТУРА

- Денисова М. Н., Абраменко Л. П. Аптечный рынок БАД. *Фармация*. 2007; 6: 43–46.
- Лубсандоржиева П. Б., Ажунова Т. А., Цыбанов К. Ц. Получение экстракта сухого из 4-компонентного сбора и содержание в нем биологически активных веществ. *Химия растительного сырья*. 2008; 1: 107–110.
- Николаева И. Г., Разуваева Я. Г., Доржиев А. М., Николаев С. М., Николаева Г. Г. Разработка растительного средства «Панкреафит», обладающего антиоксидантным и панкреозащитным действием. *Acta biomedica scientifica*. 2011; 1–2(77): 159–164.
- Самылина И. А., Блинова О. А., Кумышева Л. А., Марченко С. Д., Иванов А. И. Перспективы создания сухих экстрактов. *Фармация*. 2006; 2: 43–46.
- Югдурова Е. Д., Николаева Г. Г., Даргаева Т. Д., Николаев С. М., Башкуева Ю. А., Маркарян А. А. Разработка способа получения сухого экстракта. *Сибирский медицинский журнал*. Иркутск. 2004; 46(5): 52–54.

6. Федосеева Л. М., Лозовицкий Д. А. Определение показателей качества сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа. *Актуальные проблемы фармакологии и фармации: ежегодн. сб науч. и метод. раб. препод., молод. уч. и студ. фарм. фак.* 2015; 12: 201–207.
7. Корочинский А. В. Определение оптимальных условий экстрагирования растительного сырья. *Актуальные проблемы фармацевтической науки и практики.* 2014; 251–255.
8. Тюлькова Ю. А., Рязанова Т. В., Еременко О. Н., Ушанов С. В. Моделирование процесса экстракции коры сосны водно-щелочным раствором. *Журнал сибирского федерального университета. Серия: Химия.* 2013; 6(3): 321–327.
9. Федосеева Л. М., Ковалев О. А., Биндюк М. А. Установление оптимальных условий экстракции листьев лопуха большого с использованием методов математического планирования. *Химия растительного сырья.* 2011; 4: 273–276.
10. Чуешов В. И. Технология лекарств промышленного производства: учебник для студ. высш. учеб. завед.: перевод с укр.: в 2 ч. Ч. 1. Винница: *Нова Книга.* 2014: 696.
11. Курегян А. Г., Степанов Э. Ф. Оптимизация технологии получения β-каротина методом математического планирования эксперимента. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2017; 1(18): 66–69.
12. Яницкая А. В., Гукасова В. В., Рабичева А. С. Методика математического моделирования процесса экстрагирования некоторых видов девясила. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.* 2014; 4(52): 109–111.
13. Пантюхина Е. В. Исследования по выбору оптимальных условий экстрагирования биологически активных веществ из травы донника лекарственного. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация.* 2006; 2: 343–345.
14. Федосеева Л. М., Бабаева М. В. Оптимизация процесса экстракции биологически активных веществ из сбора для лечения заболевания почек. *Химия растительного сырья.* 2010; 1: 155–160.
15. Milić P. S., Rajković K. M., Stamenković O. S., Bekrić D. M., Arsić-Arsenijević V., Jovanović P. D., Veljković V. B. Statistical modeling and optimization of classical and ultrasound-assisted extraction of the minerals from *Galium mollugo* L. by response surface methodology and genetic algorithm. *Journal of food processing and preservation.* 2018; 42(3). Doi.org/10.1111/jfpp.13552. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.13552>.
16. Gong Y., Hou Z., Gao Y., Xue Y., Liu X., Liu G. Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology.* 2012; 90: 9–16. DOI: 10.1016/j.fbp.2010.12.004.
17. Yim H. S., Chye F. Y., Koo S. M., Matanjun P., How S. E., Ho C. W. Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, *Pleurotus porrigens*. *Food and Bioprocess Technology.* 2012; 90: 235–242. DOI: 10.1016/j.fbp.2011.04.001.
18. Водные извлечения. Настои и отвары. Available at: <http://www.fito.nnov.ru/technology/technology01.phtml>.
19. Пономарев В. Д. Экстрагирование лекарственного сырья. М.: *Медицина*, 1976: 202.
20. Беликов В. Г., Пономарев В. Д., Коковкин-Щербак Н. И. Применение математического планирования и обработки результатов эксперимента в фармации. М.: *Медицина*, 1983: 232.
21. Федосеева Л. М., Чистова Ю. И. Установление технологических параметров сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа. *Бюллетень медицинской науки.* 2018; 2(10): 37–41.
22. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. М., 2015; 2: 1004. Available at: [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_1/HTML/](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/)
23. Samylina I. A., Blinova O. A., Kumysheva L. A., Marchenko S. D., Ivanov A. I. Prospects for designing dry extracts. *Pharmacy.* 2006; 2: 43–46 (In Russ.).
24. Yugurova E. D., Nikolaeva G. G., Dargaeva T. D., Nikolaev S. M., Bashkueva Yu. A., Markaryan A. A. Working out the method of producing dry extract. *Siberian Medical Journal. Irkutsk.* 2004; 46(5): 52–54 (In Russ.).
25. Fedoseeva L. M., Lozovitskij D. A. Determination of quality indicators for the specie of dandelion medicinal herbs and large burdock leaf. *Actual problems of pharmacology and pharmacy: collection of scientific and methodological works of teachers, young scientists and students of the faculty of Pharmacy.* 2015; 12: 201–207 (In Russ.).
26. Korochinskij A. V. Definition of optimum conditions of extraction of vegetable raw materials. *Actual problems of pharmaceutical science and practices.* 2014; 251–255 (In Russ.).
27. Tyul'kova Yu. A., Ryazanova T. V., Eremenko O. N., Ushanov S. V. Modelling of the Process of Extraction of the Pine Bark of Water-Alkaline Solution. *Journal of Siberian Federal University. Chemistry.* 2013; 6(3): 321–327 (In Russ.).
28. Fedoseeva L. M., Kovalev O. A., Bindyuk M. A. The establishment of optimal conditions for the extraction of burdock leaves using mathematical planning methods. *Chemistry of plant raw material.* 2011; 4: 273–276 (In Russ.).
29. Chueshov V. I. Technology of industrial drugs: textbook for students. higher. studies. head.: translated from Ukr.: 2 h. 1. Vinnitsa: *New Book.* 2014: 696 (In Russ.).
30. Kuregyan A. G., Stepanov E. F. Technology optimization of β-carotene production by means of mathematical design. *Drug Development & Registration.* 2017; 1(18): 66–69 (In Russ.).
31. Yanitskaya A. V., Gukasova V. V., Rabicheva A. S. Mathematical modeling technique of the extraction process of inula species. *Journal of Volgograd State Medical University.* 2014; 4(52): 109–111 (In Russ.).
32. Pantyukhina E.V. Researches at the choice of optimum conditions extract biologically active substances from a grass melilotus officinalis. *Bulletin of VSU. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy.* 2006; 2: 343–345 (In Russ.).
33. Fedoseeva L. M., Babaeva M. V. Optimization of the extraction of biologically active substances from the species for the treatment of kidney disease. *Chemistry of plant raw material.* 2010; 1: 155–160 (In Russ.).
34. Milić P. S., Rajković K. M., Stamenković O. S., Bekrić D. M., Arsić-Arsenijević V., Jovanović P. D., Veljković V. B. Statistical modeling and optimization of classical and ultrasound-assisted extraction of the minerals from *Galium mollugo* L. by response surface methodology and genetic algorithm. *Journal of food processing and preservation.* 2018; 42(3). Doi.org/10.1111/jfpp.13552. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.13552>.
35. Gong Y., Hou Z., Gao Y., Xue Y., Liu X., Liu G. Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology.* 2012; 90: 9–16. DOI: 10.1016/j.fbp.2010.12.004.
36. Yim H. S., Chye F. Y., Koo S. M., Matanjun P., How S. E., Ho C. W. Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, *Pleurotus porrigens*. *Food and Bioprocess Technology.* 2012; 90: 235–242. DOI: 10.1016/j.fbp.2011.04.001.
37. Water extraction. Infusions and decoctions. Available at: <http://www.fito.nnov.ru/technology/technology01.phtml> (in Russ.).
38. Ponomarev V. D. Extraction from plant raw material. М.: *Медицина*, 1976: 202 (In Russ.).
39. Belikov V. G., Ponomarev V. D., Kokovkin-Shcherbak N. I. Application of mathematical planning and processing of experimental results in pharmacy. М.: *Медицина*, 1983: 232 (In Russ.).
40. Fedoseeva L. M., Chistova Yu. I. Establishment of technological parameters of the dandelion medicinal herb and a large burdock leaf specie. *Bulletin of Medical Science.* 2018; 2(10): 37–41 (In Russ.).
41. Russian Federation State Pharmacopoeia XIII ed. М., 2015; 2: 1004. Available at: [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_1/HTML/](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/) (in Russ.).

## REFERENCES

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-29-36  
УДК 661.12-93:615.454.001.53

## ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ НА ЭТАПЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Н. А. Ляпунов<sup>1\*</sup>, Е. П. Безуглая<sup>1</sup>, А. Н. Ляпунов<sup>1</sup>, И. А. Зинченко<sup>1</sup>, Е. Ю. Брылёва<sup>1</sup>,  
А. А. Лысокобылка<sup>1</sup>

1 – ГНУ «НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины, 61072, Украина, г. Харьков, пр. Науки, 60

\*Контактное лицо: Ляпунов Николай Александрович. E-mail: lyapunov.na@gmail.com

Статья получена: 16.01.2019. Статья принята к печати: 23.01.2019

### Резюме

**Введение.** При разработке лекарственных препаратов необходимо использовать лабораторное оборудование, моделирующее опытно-промышленное и промышленное оборудование. Для производства мягких лекарственных средств (МЛС) ключевыми видами оборудования являются диспергаторы «ротор-статор» и вакуумные реакторы-гомогенизаторы.

**Цель.** Исследование функциональных характеристик лабораторного оборудования: диспергатора Megatron® MT 1-50 SHS F/2 («Kinematica AG», Швейцария) и вакуумного реактора-гомогенизатора РП-5 («Промвит», Украина).

**Материалы и методы.** При разработке препарата-генерика *Пенцикловир крем 1%* методами оптической микроскопии и лазерной дифракции изучен размер частиц в суспензии пенцикловира исходно и после диспергирования. В креме, изготовленном в реакторе, методом оптической микроскопии определен размер частиц дисперсной фазы эмульсии м/в суспензии, а также отсутствие пузырьков воздуха. Методом жидкостной хроматографии в 9 пробах крема, отобранных из реактора, определено содержание пенцикловира. Методом ротационной вискозиметрии исследованы реологические свойства крема. Методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой изучено выделение примесей металлов в суспензию и крем из оборудования.

**Результаты и обсуждение.** С увеличением частоты вращения ротора размер частиц пенцикловира в суспензии уменьшается. Диспергатор эффективно выполняет своё функциональное назначение при частоте вращения ротора 25000 об/мин. В креме, изготовленном в реакторе, отклонения в количественном содержании пенцикловира от среднего значения в каждой пробе находятся в рамках неопределённости аналитической методики, что свидетельствует о его однородном распределении. Реактор обеспечивает эффективное диспергирование и однородное распределение масляной фазы, предотвращает образование газовой эмульсии и позволяет получить крем, который по реологическим свойствам соответствует референтному препарату *Фенистил® Пенцивир крем 1%*. В процессе производства в суспензию и крем не выделяются примеси металлов из оборудования.

**Заключение.** Диспергатор и реактор при производстве крема с пенцикловиром эффективно выполняют своё функциональное назначение. На участках производства МЛС рационально совмещать эти два вида оборудования. Диспергатор также пригоден для изготовления эмульсий с очень маленьким размером частиц дисперсной фазы.

**Ключевые слова:** пенцикловир, суспензия, эмульсия, крем, диспергатор, реактор-гомогенизатор, размер частиц, однородность, примеси элементов.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Ляпунов Н. А., Безуглая Е. П., Ляпунов А. Н., Зинченко И. А., Брылёва Е. Ю., Лысокобылка А. А. Лабораторное оборудование на этапе фармацевтической разработки мягких лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 29–36.

## LABORATORY EQUIPMENT DURING PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT OF SEMI-SOLID PREPARATIONS

Н. А. Lyapunov<sup>1\*</sup>, Е. P. Bezuglaya<sup>1</sup>, А. N. Lyapunov<sup>1</sup>, I. A. Zinchenko<sup>1</sup>, K. Yu. Bryleva<sup>1</sup>, A. A. Lysokobilka<sup>1</sup>

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

\*Corresponding author: Nikolay A. Lyapunov. E-mail: lyapunov.na@gmail.com

Received: 16.01.2019. Accepted: 23.01.2019

### Abstract

**Introduction.** When developing drugs it is necessary to use laboratory equipment that simulates pilot and industrial equipment. For the production of semi-solid preparations the key equipment are rotor-stator dispersers and vacuum reactors-homogenizers.

**Aim.** Investigation of the functional characteristics of laboratory equipment: Megatron® MT 1-50 dispersant SHS F/2 (Kinematica AG, Switzerland) and the RP-5 vacuum homogenizer reactor (Promvit, Ukraine).

**Materials and methods.** During development a generic product *Penciclovir cream 1%* the initial particle size in suspension of penciclovir and particle size after grinding were studied by optical microscopy and laser diffraction methods. In a cream made in the reactor, the particle size of the dispersed phase of the o/w emulsion and suspension, as well as the absence of air bubbles, were determined by optical microscopy. The assay of penciclovir in 9 samples of the cream taken from the reactor-homogenizer was performed by liquid chromatography. By the of rotational viscometry method the rheological properties of the cream were studied. By the inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy the getting of metal impurities from the disperser and the reactor-homogenizer into the suspension and cream were investigated.

**Results and discussion.** With an increase in the rotor speed, the particle size of penciclovir in suspension decreases. The disperser effectively performs its function at a rotor speed of 25,000 rpm. In a cream made in the reactor, the deviations in the quantitative content of penciclovir from the average value in each sample are within the uncertainty of the analytical procedure, which indicates its uniform distribution. The reactor provides effective dispersion and uniform distribution of the oil phase, prevents the formation of a gas emulsion and allows getting a cream that, according to its rheological properties, corresponds to the reference preparation *Fenistil® Pencivir cream 1%*. In the production process metal impurities were not emitted into the suspension and the cream from the equipment.

**Conclusion.** The disperser and the reactor during the production of cream with penciclovir are suitable for their intended use. It is rational to combine these two types of equipment at the sites for the production of semi-solid preparations. The disperser can also be used to produce emulsions with a very small particle size of the dispersed phase.

**Keywords:** penciclovir, suspension, emulsion, cream, disperser, reactor-homogenizer, particle size, uniformity, elemental impurities.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Lyapunov N. A., Bezuglaya E. P., Lyapunov A. N., Zinchenko I. A., Bryleva K. Yu., Lysokobilka A. A. Laboratory equipment during pharmaceutical development of semi-solid preparations. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 29–36.



## ВВЕДЕНИЕ

В течение жизненного цикла лекарственных препаратов должна быть система мониторинга их качества и функциональных характеристик процессов [10]. При фармацевтической разработке [11] необходимо достичь надлежащего уровня понимания процесса и препарата, а также стратегии контроля, основанной на управлении рисками для качества [9]. Масштабирование процесса может быть достигнуто без потери качества, если на этапе разработки определены критические показатели процесса и критические показатели качества продукции, которые должны быть указаны в регистрационном досье [6]. В описании производственного процесса в регистрационном досье должен быть указан соответствующий тип оборудования и перечень параметров процесса, которые были обоснованы на этапе фармацевтической разработки [8]. Понимание процесса, его надёжное масштабирование и создание системы мониторинга при серийном производстве возможны, если при фармацевтической разработке используется качественное оборудование, соответствующее своему назначению и моделирующее опытно-промышленное и промышленное оборудование. В идеальном случае технологическое оборудование на этих трёх этапах жизненного цикла должно быть изготовлено одним и тем же производителем.

Для производства мягких лекарственных средств (МЛС) ключевыми являются 2 вида оборудования: 1) высокоскоростные диспергаторы типа «ротатор-статор», необходимые для измельчения твёрдых и/или жидких частиц дисперсной фазы, и 2) вакуумные реакторы-гомогенизаторы, функциональное назначение которых может быть связано с процессами нагревания и охлаждения, плавления, эмульгирования, кристаллизации, гелеобразования, дегазации и перемешивания

для достижения однородного распределения компонентов, а также обеспечения необходимых реологических свойств МЛС.

**Цель работы** – исследование функциональных характеристик лабораторного оборудования: диспергатора типа «ротатор-статор» Megatron® MT 150 SHS F/2 («Kinematica AG», Швейцария) (рисунок 1) и вакуумного реактора-гомогенизатора РП-5 («Промвит», Украина) (рисунок 2).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Функциональные характеристики оборудования исследовали на этапе фармацевтической разработки препарата-генерика *Пенцикловир крем 1%* при изготовлении лабораторных серий (массой 3 кг). В состав препарата входит 1% пенцикловира (CAS №: [39809-25-1]) [1]. Использовали немикронизированную субстанцию пенцикловира («Changzhou Kony Pharmaceutical Co, Ltd», Китай; серия PCV20170301, изготовлен 01.03.2017, годен до 28.02.2019). Крем готовили на основе эмульсии м/в, содержащей воду очищенную и пропиленгликоль (ПГ) (растворители, компоненты дисперсионной среды), макрогола 20 цетостеариловый эфир (эмульгатор м/в), цетостеариловый спирт (эмульгатор в/м), вазелиновое масло и вазелин белый (эмульгаторы, компоненты дисперсной фазы). Все вспомогательные вещества соответствовали требованиям Европейской Фармакопеи [12].

Пенцикловир диспергировали в смешанном растворителе *вода – ПГ* с помощью диспергатора Megatron® MT 1-50 SHS F/2 (далее – диспергатор), варьируя частоту вращения ротора в пределах 5000–25000 об/мин. Массовое соотношение пенцикловира и смешанного растворителя составляло 1:4. При диспергировании не допускали нагрева суспензии выше 40 °С во избежание избыточного растворения пенцикловира.



А



Б

Рисунок 1. Диспергатор Megatron® MT 1-50 SHS F/2 в комплекте с термостатом Julabo F-25 («Julabo Labortechnik GmbH», Германия) (А) и сменные статоры к диспергатору (Б)

Figure 1. Megatron® MT 1-50 SHS F / 2 disperser with Julabo F-25 thermostat («Julabo Labortechnik GmbH», Germany) (A) and replaceable stators to disperser (B)



Рисунок 2. Вакуумные реакторы-гомогенизаторы (слева направо): РП-5-ВК, РП-5Д и РП-5  
Примечание. Реактор РП-5Д может работать под давлением до 10 МПа

Figure 2. Vacuum reactor-homogenizer (from left to right): RP-5-VK, RP-5D and RP-5  
Note. RP-5D reactor can operate under pressure up to 10 MPa

ра и его перекристаллизации при охлаждении с образованием крупных кристаллов. Суспензию охлаждали путём подачи в рубашку ёмкости диспергатора воды с температурой  $(1,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$  при помощи термостата Julabo F-25 («Julabo Labortechnik GmbH», Германия).

Размер частиц и их распределение по размерам определяли методом лазерной дифракции [12] на лазерном дифракционном анализаторе частиц SALD-2201 («Shimadzu», Япония). Для изготовления испытуемого образца в стакан вместимостью 50 мл отвешивали 500 мг суспензии и прибавляли 20 мл воды очищенной. Стакан помещали на ультразвуковую баню типа УЗМ (мощностью 250 ВА) и суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин при температуре  $20\text{--}25^\circ\text{C}$  для разрушения агрегатов частиц. 1 мл обработанной суспензии помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили водой очищенной до метки и перемешивали (испытуемый образец, содержащий  $\sim 0,1$  мг/мл пенцикловира). Размер частиц в неразведенной суспензии определяли также методом оптической микроскопии [12] с помощью микроскопа с окуляр-микрометром «Krüss MBL 2100» («A. Krüss Optronic», Германия).

При изготовлении крема в реакторе-гомогенизаторе (далее – реактор) необходимо заэмульгировать масляную фазу, обеспечить однородность распределения пенцикловира и масляной фазы, предотвратить образование газовой эмульсии и изготовить препарат кремообразной консистенции с определёнными реологическими свойствами. В связи с этим методом оптической микроскопии [12] в креме определяли размер частиц пенцикловира, масляной фазы и наличие пузырьков воздуха, а также проводили реологические исследования методом ротационной вискозимет-

рии [12] на реовискозиметре с коаксиальными цилиндрами «Rheolab QC» («Anton Paar», Австрия).

Однородность распределения лекарственных и вспомогательных веществ является критическим показателем качества МЛС, который не включают в спецификации. Однородность МЛС – это такая идентичность их количественного состава, структуры и свойств по всему объёму, при которой отличия в количественном составе, структуре и свойствах в разных участках этого объёма являются недостоверными или статистически незначимыми [3].

Для определения однородности распределения пенцикловира в объёме крема использован подход, основанный на сходимости результатов количественного определения пенцикловира в 9 пробах крема, отобранных «по спирали» из разных точек реактора. Для оценки сходимости, как и при валидации аналитических методик, использован относительный доверительный интервал, который должен быть меньше максимально допустимой неопределённости результатов анализа  $\Delta_{A_5} \leq 1,6\%$ , поскольку допуски содержания пенцикловира в креме составляют  $\pm 5\%$  от номинального содержания ( $\Delta_{A_5} = 5\% \cdot 0,32 = 1,6\%$ ) [5]. Анализ выполняли по разработанной нами методике количественного определения пенцикловира методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [12] на хроматографе Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D («Shimadzu», Япония) в следующих условиях:

- хроматографическая колонка размером  $250 \times 4,6$  мм, заполненная силикагелем для хроматографии октадецилсилильным с размером частиц 5 мкм;
- подвижная фаза: ацетатный буферный раствор pH 4,5 – метанол (88:12);
- скорость подвижной фазы 1,0 мл/мин;
- температура колонки  $40^\circ\text{C}$ .

По результатам валидации, проведённой в соответствии с установленными требованиями [5], методика количественного определения пенцикловира в креме методом ВЭЖХ в диапазоне применения методики от 80 до 120% от номинального содержания пенцикловира соответствует критериям приемлемости для таких валидационных характеристик, как специфичность, правильность, сходимость и линейность. Полная прогнозируемая неопределённость результатов анализов составляет 0,845% и не превышает критическое значение 1,6%. На рисунке 3 представлены хроматограммы раствора плацебо, испытуемого раствора и стандартного раствора, демонстрирующие специфичность методики.

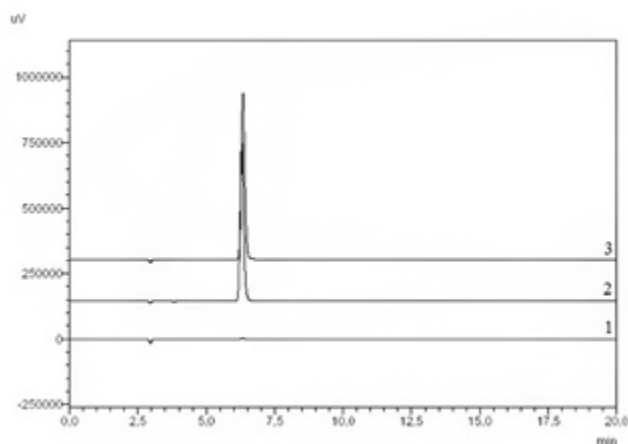


Рисунок 3. Хроматограммы: 1 – раствора плацебо (раствора основы крема); 2 – испытуемого раствора препарата Пенцикловир крем 1%; 3 – стандартного раствора пенцикловира. Пик со временем удерживания ~6,3 мин соответствует пенцикловиру

Figure 3. Chromatograms: 1 – placebo solution (solution of the base of the cream); 2 – test solution of penciclovir cream 1%; 3 – penciclovir standard solution. Peak with a retention time of ~6.3 min corresponds to penciclovir

Для целей данной статьи следует отметить, что при валидации методики и статистической обработке результатов количественного определения ( $\bar{Z}$ ) пенцикловира в 9 модельных растворах, содержащих от 80 до 120% пенцикловира от его концентрации в стандартном растворе, найденное значение относительного доверительного интервала величины  $\bar{Z}$  составило 0,1371%, что меньше критического значения для сходимости результатов  $\Delta_{As} = 1,6\%$ .

Состав стали, из которой изготовлены статоры диспергатора, определяли методом рентгенфлуоресцентной спектроскопии на спектрометре Elvatech ElvaX-light («Elvatech», Украина). По данным анализа статор изготовлен из сплава, содержащего 9,2% Cr; 1,1% Mn; 80,3% Fe; 7,2% Ni; 0,1% Cu; 1,6% Mo и 0,5% C. Детали реактора РП-5, контактирующие с кремом, изготовлены из стали марки AISI 316L, содержащей 17,0% Cr; 9,0% Ni; 2,0% Mo; 71,97% Fe и 0,03% C.

Суточная экспозиция примесей элементов, в частности, Cr, Ni, Mo и Cu, нормируется в препаратах для инъекционного, орального и ингаляционного применения [7]. Представляло интерес определить возможное выделение этих элементов из оборудования в суспензию и крем, поскольку выделение металлов может представлять риски как для безопасности, так и для качества препарата.

Содержание металлов определяли на атомно-эмиссионном спектрометре iCAP 6300 Duo («ThermoFisher Scientific», США) методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой [12] по следующей методике:

**Испытуемый раствор.** 1,5 г суспензии или крема помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл концентрированной азотной кислоты, перемешивают до растворения и доводят объём водой до метки.

**Раствор сравнения.** 5 мл концентрированной азотной кислоты переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объём раствора водой Р до метки.

Калибровку проводили по эталонным растворам, содержащим ионы металлов в следующих концентрациях: Cr (0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,0 мг/л), Cu (0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,0 мг/л), Mo (0,2 мг/л, 1,0 мг/л), Fe (0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,0 мг/л), Mn (0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,0 мг/л), Ni (0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,0 мг/л).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 4 представлены микрофотографии суспензий пенцикловира, а на рисунке 5 и в таблице 1 – результаты их исследования методом лазерной дифракции.

В спецификации на референтный препарат Фенистил® Пенцивир крем 1% («Новартис Фарма Продакшнс ГмбХ», Германия) указано, что «размер большинства частиц не должен превышать 100 мкм, ни одна из частиц не должна по длине превышать 400 мкм в образце, масса которого не менее 5 мг» [1, 4]. Этим нормам должен соответствовать и препарат-генерик. Немикронизированный пенцикловир содержит ~30% частиц размерами >100 мкм и частицы размерами до 900 мкм (рисунок 5, таблица 1), в связи с чем его необходимо измельчать.

С увеличением частоты вращения ротора эффективность диспергирования возрастает (таблица 1, рисунки 4 и 5). При частоте вращения ротора 25000 об/мин в течение 45 с размер частиц существенно уменьшился (таблица 1), содержание частиц размером более 100 мкм снизилось до ~1,2%, а максимальный размер единичных частиц (0,002%) составил 258,241 мкм. Вероятность обнаружения в креме частиц пенцикловира размером более 100 мкм крайне мала. То есть диспергатор эффективно выполнил своё



Таблица 1. Максимальный размер частиц (D) пенцикловира в разных фракциях суспензии, содержащих от 10 до 90% частиц от их общего числа в анализируемом образце суспензии (№ образца суспензии см. на рисунке 5)

Table 1. The maximum particle size (D) of penciclovir in different suspension fractions containing from 10 to 90% of particles from their total number in the analyzed sample of suspension (for the suspension sample number, see Figure 5)

| № | D (мкм) во фракциях, содержащих долю от общего числа частиц (%): |        |        |        |        |        |        |         |         |
|---|------------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
|   | 10%                                                              | 20%    | 30%    | 40 %   | 50%    | 60%    | 70%    | 80%     | 90%     |
| 1 | 33,319                                                           | 43,131 | 52,175 | 61,172 | 71,024 | 82,493 | 96,652 | 116,922 | 151,284 |
| 2 | 28,002                                                           | 36,488 | 44,136 | 52,032 | 60,445 | 70,431 | 82,708 | 99,429  | 129,512 |
| 3 | 24,795                                                           | 32,300 | 39,136 | 46,014 | 53,773 | 62,609 | 74,022 | 89,999  | 117,590 |
| 4 | 18,880                                                           | 24,783 | 29,911 | 35,268 | 41,200 | 48,008 | 56,756 | 68,891  | 90,195  |
| 5 | 15,511                                                           | 20,821 | 25,836 | 31,019 | 36,793 | 43,741 | 52,522 | 64,992  | 88,066  |
| 6 | 16,340                                                           | 20,544 | 24,183 | 27,822 | 31,787 | 36,297 | 41,804 | 49,106  | 61,703  |

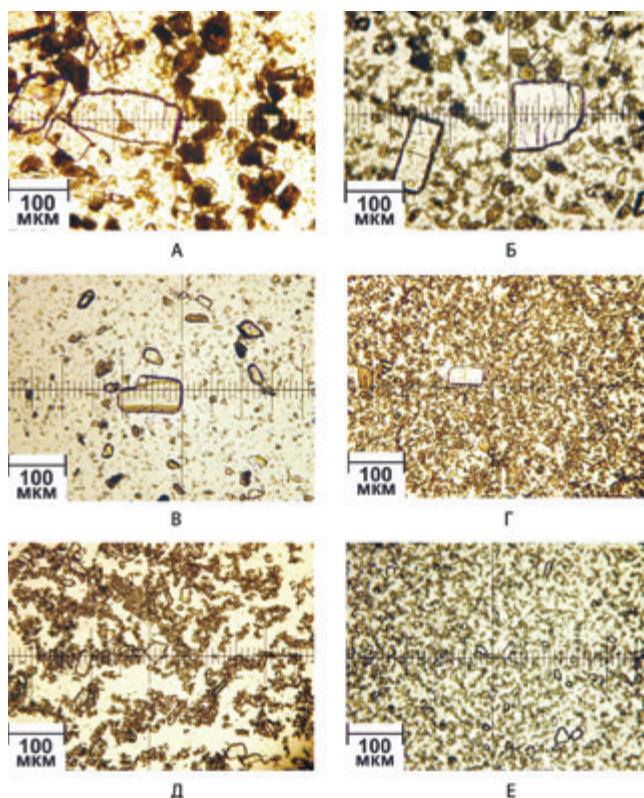


Рисунок 4. Микрофотографии суспензий пенцикловира исходно (А) и после диспергирования при частоте вращения ротора: 5000 об/мин (Б); 10000 об/мин (В); 15000 об/мин (Г) (в течение 3 мин); 20000 об/мин (в течение 1,5 мин) (Д); 25000 об/мин (в течение 45 с) (Е)

Figure 4. Microphotographs of penciclovir suspensions initially (A) and after grinding at a rotor speed: 5000 rpm (B); 10,000 rpm (V); 15,000 rpm (D) (for 3 min); 20,000 rpm (for 1.5 min) (D); 25,000 rpm (for 45 s) (E)

функциональное назначение, а изготовленная суспензия пригодна для производства препарата *Пенцикло-  
вир крем 1,0%*.

Для изготовления крема использовали вакуумный реактор РП-5 со встроенным гомогенизатором, якорной (скребковой и лопастной) мешалкой и водяной рубашкой (рисунок 2). Масляную фазу эмульгировали при температуре  $70 \pm 2$  °C и частоте вращения ротора

3000 об/мин, одновременно перемешивая её скребковой и лопастной мешалками. Суспензию пенцикловира вводили в основу при температуре ниже 40 °C, но выше температуры золь → гель перехода. Крем гомогенизировали и далее охлаждали до температуры 25 °C при перемешивании только якорной мешалкой. Все процессы эмульгирования, гомогенизации и перемешивания проводили под вакуумом глубиной от –0,05 МПа до –0,07 МПа.

Как видно из микрофотографии изготовленного крема (рисунок 6), в креме однородно распределены частицы масляной фазы размером 1–5 мкм и отсутствуют пузырьки воздуха, что свидетельствует об эффективности как эмульгирования, так и дегазации при вакуумировании. На микрофотографии видны суспендированные частицы пенцикловира размером приблизительно от 1 мкм до 15 мкм. Оценить однородность распределения пенцикловира в креме по микрофотографии не представляется возможным. Поэтому для оценки однородности распределения пенцикловира проводили его количественное определение в 9 пробах крема, отобранных из разных точек реактора [3]. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Как следует из таблицы 2, относительный доверительный интервал, характеризующий сходимость результатов количественного определения пенцикловира в 9 пробах крема, в 1,65 раза меньше максимально допустимой полной неопределённости методики анализа  $\Delta_{As} \leq 1,6\%$  ( $B=5,0\%$ ). То есть отклонения в содержании пенцикловира от среднего значения в каждой из 9 проб находятся в рамках неопределённости аналитической методики и статистически незначимы, а распределение пенцикловира в креме является однородным. Сопоставимость относительных доверительных интервалов, полученных при валидации аналитической методики (0,1371%) и определения однородности (0,9669 %), подтверждает, что вариабельность содержания пенцикловира в пробах крема находится в рамках неопределённости аналитической методики.

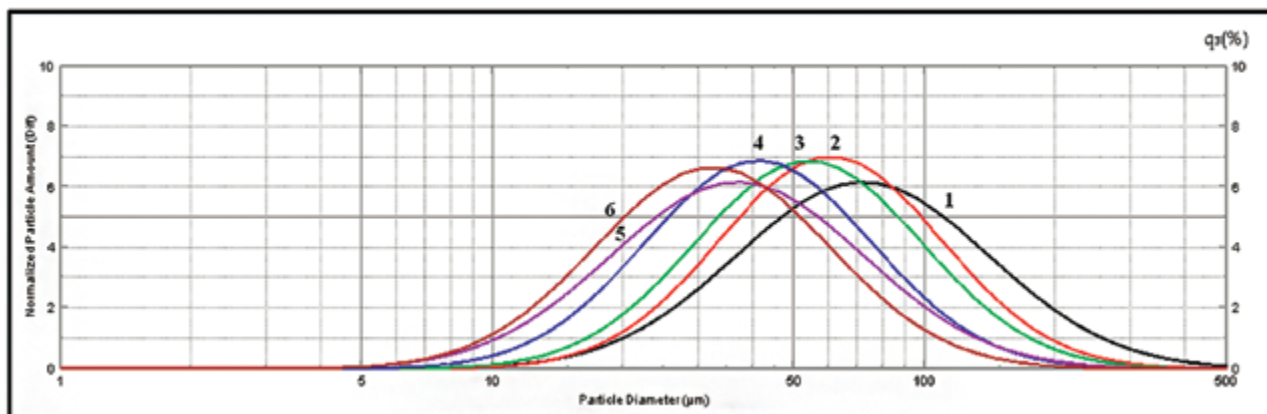


Рисунок 5. Распределение по размерам частиц пенцикловира в суспензиях: исходно (1), после диспергирования при частоте вращения ротора 5000 об/мин (2), 10000 об/мин (3) и 15000 об/мин (4) (в течение 3 мин), 20000 об/мин (в течение 1,5 мин) (5) и 25000 об/мин (в течение 45 с) (6)

Figure 5. The particle size distribution of penciclovir in suspensions: initially (1), after grinding at a rotor speed of 5000 rpm (2), 10,000 rpm (3) and 15000 rpm (4) (for 3 min), 20000 rpm (for 1.5 min) (5) and 25000 rpm (for 45 s) (6)

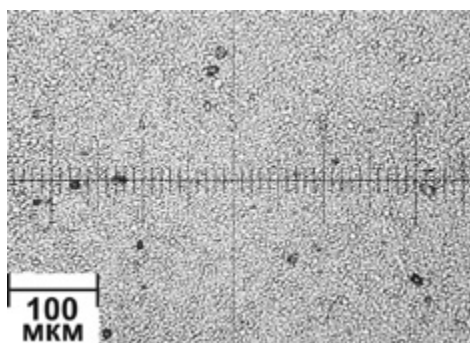


Рисунок 6. Микрофотография препарата Пенцикловир крем 1%, в состав которого была введена суспензия № 6; увеличение  $\times 150$

Figure 6. Microphotograph of the Penciclovir cream 1%, into which suspension number 6 was introduced; magnification  $\times 150$

На рисунке 7 представлены реограммы изготовленного крема и препарата *Фенистил® Пенцивир крем 1%* («Новартис Фарма Продукционс ГмбХ», Германия; серия WT293, изготовлен 05.2017, годен до 04.2020).

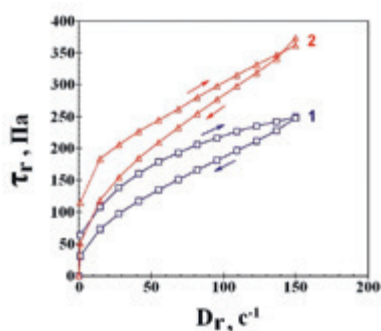


Рисунок 7. Реограммы при температуре 25 °C препаратов *Фенистил® Пенцивир крем 1%* (1) и *Пенцикловир крем 1%* (2)

Figure 7. Rheograms at 25 °C of the preparations *Fenistil® Penzivir Cream 1%* (1) and *Penciclovir Cream 1%* (2)

Таблица 2. Результаты количественного определения пенцикловира в 9 пробах крема, их статистическая обработка и оценка

Table 2. The results of assay of penciclovir in 9 samples of the cream, their statistical processing and evaluation

| № пробы                                                                                              | Содержание пенцикловира в пробе, мг/г | Содержание пенцикловира (нормализованные значения), % |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 1                                                                                                    | 10,05                                 | 100,5                                                 |
| 2                                                                                                    | 9,98                                  | 99,8                                                  |
| 3                                                                                                    | 10,11                                 | 101,1                                                 |
| 4                                                                                                    | 10,05                                 | 100,5                                                 |
| 5                                                                                                    | 10,12                                 | 101,2                                                 |
| 6                                                                                                    | 9,99                                  | 99,9                                                  |
| 7                                                                                                    | 10,06                                 | 100,6                                                 |
| 8                                                                                                    | 10,06                                 | 100,6                                                 |
| 9                                                                                                    | 9,98                                  | 99,8                                                  |
| Среднее                                                                                              | 10,044                                | 100,44                                                |
| Относительное стандартное отклонение ( $RSD_z$ )                                                     |                                       | 0,5200                                                |
| Относительный доверительный интервал $\Delta_z = t(95\%, 9 - 1) \cdot RSD_z = 1,8595 \cdot 0,5200\%$ |                                       | 0,9669                                                |
| Критическое значение для сходимости результатов ( $\Delta_{Ac}$ )                                    |                                       | 1,6                                                   |
| Оценка однородности по сходимости:                                                                   |                                       | $0,9669 < 1,6$                                        |
| Вывод                                                                                                |                                       | Распределение однородно                               |

Как видно из рисунка 7, в реакторе РП-5 изготовлен крем, имеющий тиксотропные свойства, о которых свидетельствует петля гистерезиса, и пластический тип течения, что соответствует реологическим свойствам референтного препарата. Реологические параметры разработанного препарата исходно после изготовления оказываются несколько выше, чем у препарата *Фенистил® Пенцивир крем 1%* со сроком хранения 9 месяцев (рисунок 7), поскольку они имеют тенденцию к уменьшению при хранении крема.

Таким образом, использование реактора РП-5 позволяет эффективно осуществлять процессы эмульгирования и гомогенизации без образования газовой эмульсии и изготавливать крем с соответствующими реологическими свойствами.

При использовании оборудования, изготовленного из нержавеющей стали, существует потенциальный риск выделения в препарат примесей металлов. Этот риск возрастает при наличии мешалок типа «ротор-статор» из-за трения металлических частей оборудования. В таблице 3 приведены данные о содержании металлов в суспензии пенцикловира до и после диспергирования при частоте вращения ротора 25000 об/мин, а также в креме после его изготовления в реакторе.

**Таблица 3. Содержание примесей металлов в суспензии пенцикловира до и после диспергирования и в креме после его изготовления**

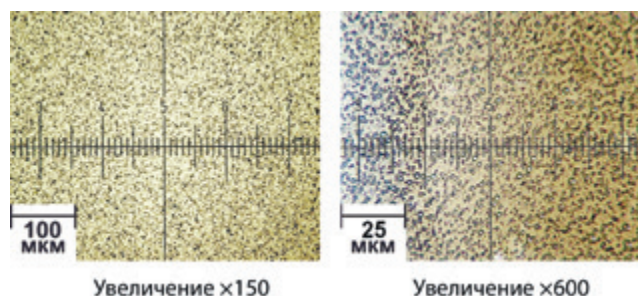
**Table 3. The content of metal impurities in the suspension penciclovir before and after grinding and in the cream after its manufacture**

| Объект                          | Содержание, мг/л, металлов: |      |      |      |       |       |
|---------------------------------|-----------------------------|------|------|------|-------|-------|
|                                 | Cr                          | Cu   | Mo   | Fe   | Mn    | Ni    |
| Предел обнаружения (ПО)         | 0,005                       | 0,01 | 0,01 | 0,03 | 0,005 | 0,005 |
| Суспензия до диспергирования    | < ПО                        | < ПО | < ПО | < ПО | < ПО  | < ПО  |
| Суспензия после диспергирования | < ПО                        | < ПО | < ПО | < ПО | < ПО  | < ПО  |
| Крем после изготовления         | < ПО                        | < ПО | < ПО | < ПО | < ПО  | < ПО  |

Как видно из таблицы 3, при диспергировании пенцикловира в жидкой среде при самой высокой частоте вращения ротора 25000 об/мин, а также при эмульгировании и гомогенизации использованное оборудование (диспергатор и реактор) не приводит к появлению в суспензии и креме примесей металлов. Это обеспечивает широкие возможности использования данного оборудования для изготовления не только МЛС, но и для производства лекарственных препаратов для орального применения, препаратов для инъекций и ингаляций [7].

Для эффективного эмульгирования и диспергирования диспергаторы рационально совмещать с реакторами в одной технологической цепочке. Следует отметить, что диспергатор Megatron® MT 1-50 SHS F/2 комплектуется разными сменными статорами, которые в зависимости от конструкции предназначены для процессов как диспергирования, так и эмульгирования (рисунок 1). Эффективность эмульгирования с помощью диспергатора оказывается очень высокой. На рисунке 8 приведены микрофотографии эмульсии в/м, изготовленной при диспергировании воды в расплавленном вазелине [12] при отсутствии эмульгаторов.

Как видно из рисунка 8, при использовании диспергатора даже в отсутствии эмульгаторов можно



**Рисунок 8. Микрофотографии эмульсии в/м, изготовленной с помощью диспергатора при частоте вращения ротора 10000 об/мин и трёхкратном прохождении эмульсии через статор-ротор**

**Figure 8. Microphotographs of the w/o emulsion made using a disperser at a rotor speed of 10,000 rpm and a triple passage of the emulsion through the stator-rotor**

получить однородную эмульсию в/м, состоящую из углеводов и воды с размером частиц водной фазы 0,5–2,0 мкм. Это важно, если в эмульсии м/в лекарственное вещество растворено в дисперсной фазе, от размера частиц которой зависит эффективность терапевтического действия [2].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы функциональные характеристики лабораторного оборудования: диспергатора Megatron® MT 1-50 SHS F/2 («Kinematica AG», Швейцария) и реактора-гомогенизатора РП-5 («Промвиг», Украина) при разработке препарата-генерика *Пенцикловир крем 1%*. Диспергатор эффективно выполняет своё функциональное назначение, что позволяет получить суспензию, которая пригодна для производства препарата. При изготовлении крема (на основе эмульсии м/в) в реакторе РП-5 проведена оценка производственного процесса. По результатам исследований реактор эффективно выполняет функциональное назначение относительно эмульгирования, гомогенизации (однородного распределения пенцикловира и масляной фазы), предотвращения образования газовой эмульсии и изготовления крема с соответствующими реологическими свойствами. В ходе производственного процесса не происходит внесения в суспензию и крем примесей металлов из диспергатора и реактора-гомогенизатора. На участках по производству МЛС диспергаторы рационально совмещать с реакторами. Диспергатор также можно использовать для получения эмульсий с очень маленьким размером частиц дисперсной фазы, что показано на примере эмульгирования воды в расплавленном вазелине.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Компендиум 2016 – лекарственные препараты / Под ред. В. Н. Коваленко. К.: МОРИОН. 2016; 2416 с.
2. Ляпунова А. М., Безугла О. П., Лібіна В. В., Андріанова Т. В. Дослідження м'яких лікарських засобів з мометазону фууроатом на



емульсійних основах. *Український біофармацевтичний журнал*. 2017; 53(6): 9–18.

3. Ляпунов Н. А., Зинченко И. А., Безуглая Е. П. Оценка однородности распределения лекарственных и вспомогательных веществ в мягких лекарственных средствах. *Фармаком*. 2015; 2: 33–40.
4. Регистр лекарственных средств России. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru> (accessed 05.08.2018).
5. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности. Методические рекомендации. Ч. I. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н. В. Юргеля, А. Л. Младенцева, А. В. Бурдейна и др. М.: Изд-во «Спорт и культура – 2000». 2007; 5–92.
6. 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.
7. EMA/CHMP/ICH/353369/2013 ICH guideline Q3D on elemental impurities, 25 July 2016.
8. EMA/CHMP/QWP/BWP/245074/2015 Guideline on manufacture of the finished dosage form, 4 July 2017.
9. EMA/INS/GMP/79766/2011 Quality Risk Management (ICH Q9), 31 January 2011.
10. EMA/INS/GMP/79818/2011 Pharmaceutical Quality System (ICH Q10), 31 January 2011.
11. 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.
12. European Pharmacopoeia. 9th Edition. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France 2016; 4016 p.

## REFERENCES

1. Compendium 2016 – drugs / Ed. V.N. Kovalenko. K.: MORION. 2016: 2416 s. (In Russ.).
2. Lyapunova A. M., Bezugla O. P., Libina V. V., Andrianova T. V. Research of soft drugs with mometasone furoate on emulsion bases. *Ukrainian biopharmaceutical magazine*. 2017; 53(6): 9–18 (In Ukr.).
3. Lyapunov N. A., Zinchenko I. A., Bezuglaya E. P. Evaluation of the homogeneity of the distribution of drugs and auxiliaries in soft drugs. *Farmakom*. 2015; 2: 33–40 (In Russ.).
4. Register of medicines of Russia. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru> (accessed 05.08.2018) (In Russ.).
5. Guide for enterprises of the pharmaceutical industry. Guidelines. Part I. Guidelines for the validation of methods for analyzing drugs / Ed. N. V. Yurgelya, A. L. Mladentseva, A. V. Burdeina i dr. M.: Publishing house «Sport and Culture – 2000». 2007; 5–92 (In Russ.).
6. 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.
7. EMA/CHMP/ICH/353369/2013 ICH guideline Q3D on elemental impurities, 25 July 2016.
8. EMA/CHMP/QWP/BWP/245074/2015 Guideline on manufacture of the finished dosage form, 4 July 2017.
9. EMA/INS/GMP/79766/2011 Quality Risk Management (ICH Q9), 31 January 2011.
10. EMA/INS/GMP/79818/2011 Pharmaceutical Quality System (ICH Q10), 31 January 2011.
11. 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.
12. European Pharmacopoeia. 9th Edition. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France 2016; 4016 p.

5-я международная практическая конференция

# «Клинические исследования в России и ЕАЭС»

18-20 марта 2019

Москва, Хилтон Ленинградская

*Организатор:*



*Bravo Business Forums*

## КОНФЕРЕНЦИЯ ПОЗВОЛИТ:

- Обсудить основные изменения в законодательстве РФ и ЕАЭС в сфере клинических исследований
- Рассмотреть особенности проведения клинических исследований на разных стадиях
- Оценить необходимость проведения аудита КИ
- Преодолеть организационные трудности проведения клинических исследований
- Проанализировать этические аспекты проведения КИ
- Узнать больше о правилах проведения КИ в ЕС
- Разобрать опыт FDA, США в проведении КИ

## СРЕДИ НАШИХ СПИКЕРОВ:

- Росздравнадзор
- Евразийская экономическая комиссия
- Ассоциации поддержки и развития фармацевтической деятельности Республики Казахстан
- EMA
- Noven Pharma, USA
- Bayer
- Novartis
- Pfizer
- GSK

## АУДИТОРИЯ КОНФЕРЕНЦИИ:

### Директора, руководители и менеджеры:

- По клиническим исследованиям
- Медицинского департамента
- Регуляторного департамента
- Контроля качества клинических исследований
- Контрактов и бюджетирования клинических исследований

из российских и международных компаний, проводящих КИ в России и на территории ЕАЭС.

**Максимум 60  
делегатов!**

+ 357 22 007896

[bravoforums.com](http://bravoforums.com)

+7 499 6776159

[info@bravoforums.com](mailto:info@bravoforums.com)

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-38-42  
УДК 543.635.9

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОФИЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

О. В. Тринева<sup>1\*</sup>, М. А. Рудая<sup>1</sup>, А. И. Сливкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская пл., 1

\*Контактное лицо: Тринева Ольга Валерьевна. E-mail: trineevaov@mail.ru

Статья получена: 26.10.2018. Статья принята к печати: 19.12.2018

### Резюме

**Введение.** В настоящее время принято считать, что род облепихи насчитывает 15 видов и подвидов, но только 4 из них нашли широкое применение на практике: китайский подвид (*sinensis*), европейский (*rhamnoides*), среднеазиатский (*turkestanica*) и сибирский (*mongolica*). Плоды облепихи крушиновидной имеют сложный химический состав, представленный такими группами биологически активных веществ (БАВ), как флавоноиды, аминокислоты, органические кислоты, дубильные вещества, водо- и жирорастворимые витамины, полисахариды, легкоусвояемые сахара. Большинство сортов облепихи выведено в НИИ садоводства Сибири им. М. А. Лисавенко. Однако, биохимический состав сортов, адаптированных для произрастания в условиях средней полосы Европейской части России, изучены мало.

**Цель.** Задачей являлось исследование профиля БАВ плодов облепихи крушиновидной различных сортов, произрастающих в условиях средней полосы Европейской части России, методом капиллярного электрофореза.

**Материалы и методы.** Проведено исследование профиля БАВ (свободных органических кислот и сахаров, а также свободных и связанных аминокислот) плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом капиллярного электрофореза. Проведено определение суммы свободных органических кислот, аминокислот, свободных и связанных сахаров.

**Результаты и обсуждение.** Различные сорта имеют свои фитохимические особенности. Сахарно-кислотный индекс плодов облепихи крушиновидной изучаемых сортов варьировал от 0,9 до 2,01, что свидетельствует об их принадлежности к группе кислых по существующей градации.

**Заключение.** В целом, качественный состав БАВ изучаемых сортов сходен между собой, но различается количественно. Выявлены сорта с максимальным и минимальным содержанием исследуемых групп БАВ.

**Ключевые слова:** плоды облепихи крушиновидной, капиллярный электрофорез, органические кислоты, аминокислоты, сахара.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Тринева О. В., Рудая М. А., Сливкин А. И. Исследование профиля биологически активных веществ плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом капиллярного электрофореза. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 38–42.

## STUDY OF THE PROFILE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF FRUITS OF SEA BUCKTHORN OF DIFFERENT VARIETIES BY THE METHOD OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS

O. V. Trineeva<sup>1\*</sup>, M. A. Rudaya<sup>1</sup>, A. I. Slivkin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – Voronezh State University, 1, University Sq., Voronezh, 394006, Russia

\*Corresponding author: Olga V. Trineeva. E-mail: trineevaov@mail.ru

Received: 26.10.2018. Accepted: 19.12.2018

### Abstract

**Introduction.** Currently, it is considered that the sea buckthorn genus includes 15 species and subspecies, but only 4 of them have found wide application in practice: the Chinese subspecies (*sinensis*), the European (*rhamnoides*), Central Asian (*turkestanica*) and Siberian (*mongolica*). Fruits of sea buckthorn have a complex chemical composition, represented by such groups of biologically active substances (BAS), as flavonoids, amino acids, organic acids, tannins, water- and fat-soluble vitamins, polysaccharides, easily digestible sugars. Most varieties of sea buckthorn bred in the Institute of horticulture Siberia M. A. Lisavenko. However, the biochemical composition of varieties adapted for growing under the conditions of the middle zone of the European part of Russia is little studied.

**Aim.** The work was to study the BAS profile of the sea-buckthorn fruits of various varieties growing in the middle zone of the European part of Russia, by capillary electrophoresis.

**Materials and methods.** The study of the profile of biologically active substances (free organic acids and sugars, as well as free and related amino acids) of sea buckthorn fruits of various varieties was carried out by capillary electrophoresis. The determination of the amount of free organic acids, amino acids, free and related sugars.

**Results and discussion.** Different varieties have their phytochemical features. The sugar-acid index of the sea-buckthorn fruits of the studied varieties varied from 0.9 to 2.01, which indicates that they belong to the acidic group according to the existing gradation.

**Conclusion.** In general, the qualitative composition of the BAS of the studied varieties is similar to each other, but it differs quantitatively. Identified varieties with a maximum and minimum content of the studied groups of biologically active substances.

**Keywords:** buckthorn berries, capillary electrophoresis, organic acids, amino acids, sugars.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Trineeva O. V., Rudaya M. A., Slivkin A. I. Study of the profile of biologically active substances of fruits of sea buckthorn of different varieties by the method of capillary electrophoresis. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 38–42.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время принято считать, что род облепихи насчитывает 15 видов и подвидов, но только 4 из них нашли широкое применение на практике: китайский подвид (*sinensis*), европейский (*rhamnoides*),

среднеазиатский (*turkestanica*) и сибирский (*mongolica*). Большое внимание исторически уделяется биохимическому составу плодов облепихи [1, с. 13]. Плоды облепихи крушиновидной (ОК) имеют сложный химический состав, представленный такими группами биологичес-



ки активных веществ (БАВ), как флавоноиды, аминокислоты (АК), органические кислоты, дубильные вещества, водо- и жирорастворимые витамины, полисахариды. Согласно литературным данным, в плодах содержатся легкоусвояемые сахара. Из углеводов в облепихе найдены глюкоза, фруктоза, сахароза. Биохимический состав зависит от места произрастания, времени сбора, сортовых особенностей и других факторов [2, с. 183; 3, с. 11]. Большинство сортов облепихи выведено в НИИ садоводства Сибири им. М. А. Лисавенко. В настоящее время наиболее распространены следующие сорта: «Новость Алтая», «Витаминная», «Золотой початок», «Дар Катуни», «Масличная», «Чуйская», «Оранжевая», «Обильная», «Золотистая», «Превосходная», «Великан», «Самородок», «Янтарная», «Обская» и другие сорта, активно культивируемые в районах Сибири [3, с. 13]. Однако, биохимический состав сортов, адаптированных для произрастания в условиях средней полосы Европейской части России, изучены мало.

Капиллярный электрофорез (КЭ) в последнее время выходит на лидирующие позиции в фармацевтическом анализе в виду таких преимуществ как доступность, экспрессность, наличие отечественной приборной базы, простота определения и невысокая стоимость одного анализа. В случае растительных объектов исследования наиболее часто данный метод применяется при определении качественного и количественного состава таких групп БАВ, как АК, органические кислоты, сахара, макроэлементы, водорастворимые витамины группы В и флавоноиды [4, с. 77, 99, 100, 115].

**Цель работы** – исследование профиля БАВ плодов облепихи крушиновидной различных сортов, произрастающих в условиях средней полосы Европейской части России, методом капиллярного электрофореза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись высушенные плоды ОК различных сортов («Столичная», «Галерит», «Рябиновая», «Ботаническая любительская», «Ботаническая», «Трофимовская», «Студенческая», «Ботаническая ароматная», «Краснокарминовая», «Нивелена»), произрастающие на Европейской территории России, заготовленные на базе Ботанического сада биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, согласно правилам заготовки лекарственного растительного сырья (ЛРС) различных морфологических групп. Сушку плодов производили при температуре 60 °С до остаточной влажности не более 14%.

Сумму свободных аминокислот (АК) в пересчете на кислоту глутаминовую, а также полисахаридов и простых восстанавливающих сахаров в пересчете на глюкозу определяли методом дифференциальной спектрофотометрии в видимой области нингидриновым методом [5, с. 64–65] и пикриновым [6, с. 548; 7] способами соответственно. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре Hitachi U1900 (Япония) в требуемом диапазоне длин волн в кварцевых кюветах толщиной 1 см относительно

но растворов сравнения. Сумму органических кислот в пересчете на кислоту яблочную определяли фармакопейным методом алкалиметрического титрования [7; 8, с. 8–9]. Полученные результаты обрабатывали в соответствии с требованиями ОФС ГФ XIII изд. [7] при использовании пакета прикладных программ обеспечения «Statistica 12.0» и «Microsoft EXCEL» 2016 г.

Для исследования специфического профиля БАВ изучаемые объекты анализировали методом КЭ на приборе «Капель-105/105М» («Люмэкс», Санкт-Петербург, Россия). Условия разделения при определении органических кислот: буфер фосфатный для анализа органических кислот. Капилляр:  $L_{эф}/L_{общ} = 40/50$  см, ID=50 мкм. Ввод пробы: 300 мбар·с. Напряжение: –17 кВ. Температура: +20 °С. Детектирование: 190 нм, косвенное [4, с. 100]. Вид полученных электрофореграмм представлен на рисунке 1. Для исследования полного аминокислотного состава (свободные и связанные АК) навески образцов гидролизovali 6 М соляной кислотой при температуре 110±5 °С в течение 16–18 часов [4, с. 95, 102]. Метод основан на получении из свободных форм АК фенилизотиокарбамильных производных, дальнейшем их разделении и количест-

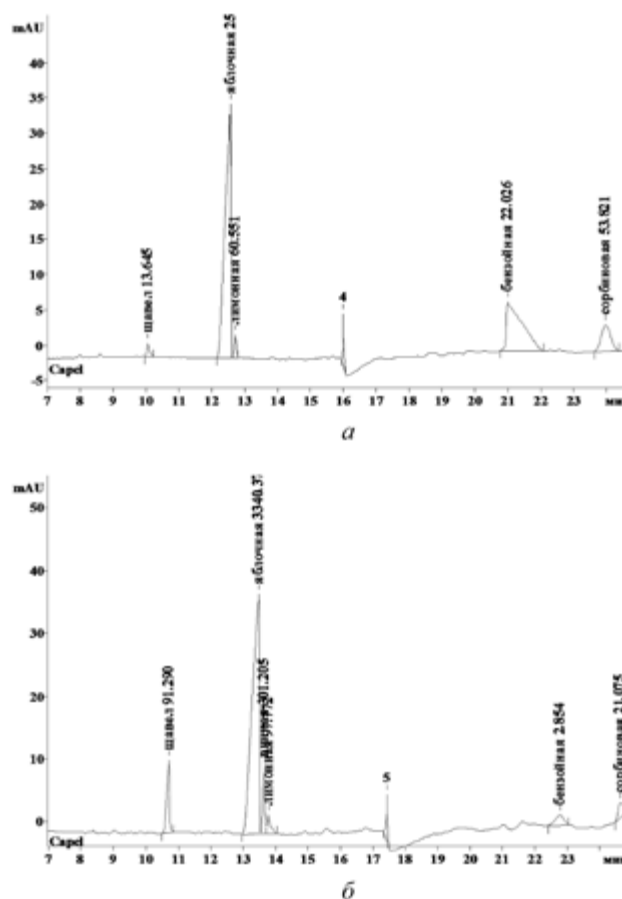


Рисунок 1. Электрофореграммы плодов ОК при определении суммы свободных органических кислот: а – сорт «Нивелена»; б – сорт «Рябиновая»

Figure 1. Electrophoregrams of fruits OK when determining the amount of free organic acids: a – the variety «Nivelena»; b – grade «Rowan»

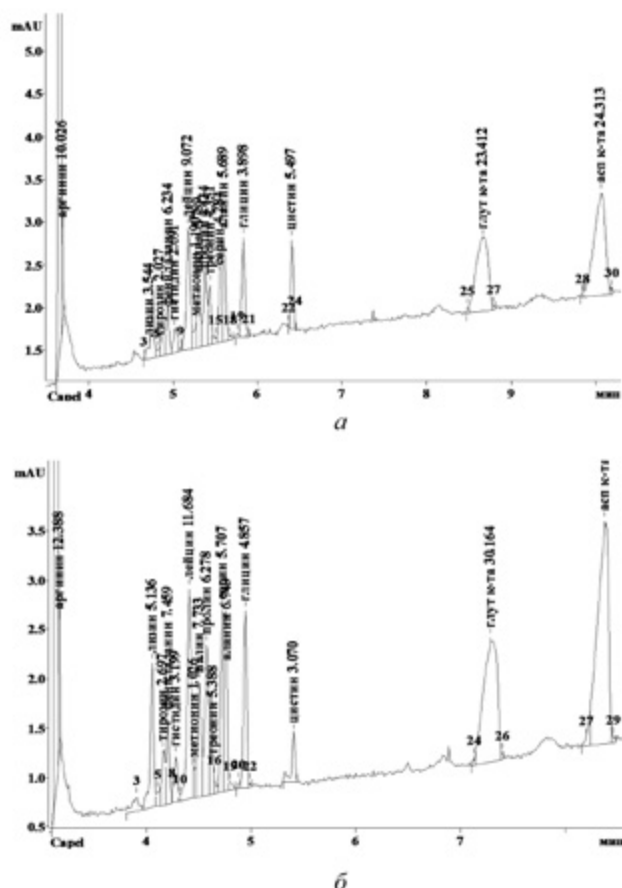


Рисунок 2. Электрофореграммы плодов ОК при определении суммы свободных и связанных АК: а – сорт «Трофимовская»; б – сорт «Нивелена»

Figure 2. Electrophoregrams of OK fruits in determining the amount of free and bound AK: a – variety «Trofimovskaya»; b – grade «Nivelena»

венном определении (рисунок 2). Условия разделения: буфер 30 мМ фосфатный, 4 мМ  $\beta$ -циклодекстрин (рН 7,4); капилляр ( $L_{\text{эфф}}/L_{\text{общ}}=65/75$  см, ID=50 мкм); ввод пробы 150 мбар·с; напряжение +25 кВ; УФ-детектирование, 254 нм; температура 30 °С [4, с. 95,102]. Метод КЭ при анализе свободных сахаров основан на экстракции дистиллированной водой из твердых проб с последующим разделением и количественным определением. Детектирование: косвенное, 254 нм. Фоновый электролит: на основе сорбата калия с добавкой ЦТАБ, рН=12,1. Капилляр:  $L_{\text{эфф}}/L_{\text{общ}}=65/75$  см, ID=50 мкм. Ввод пробы: 150 мбар·с. Напряжение: –25 кВ. Температура: 20 °С [4, 212 с.]. Вид электрофореграмм сахаров исследуемого ЛРС показан на рисунке 3. Сбор, обработку и вывод данных осуществляют с помощью персонального компьютера с операционной системой не ниже «Windows® 2000/XP», на котором установлено специализированное программное обеспечение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Так как сортовые особенности накопления БАВ в ЛРС в рамках одного вида имеют сходный характер, обусловленный генотипом, но различающийся

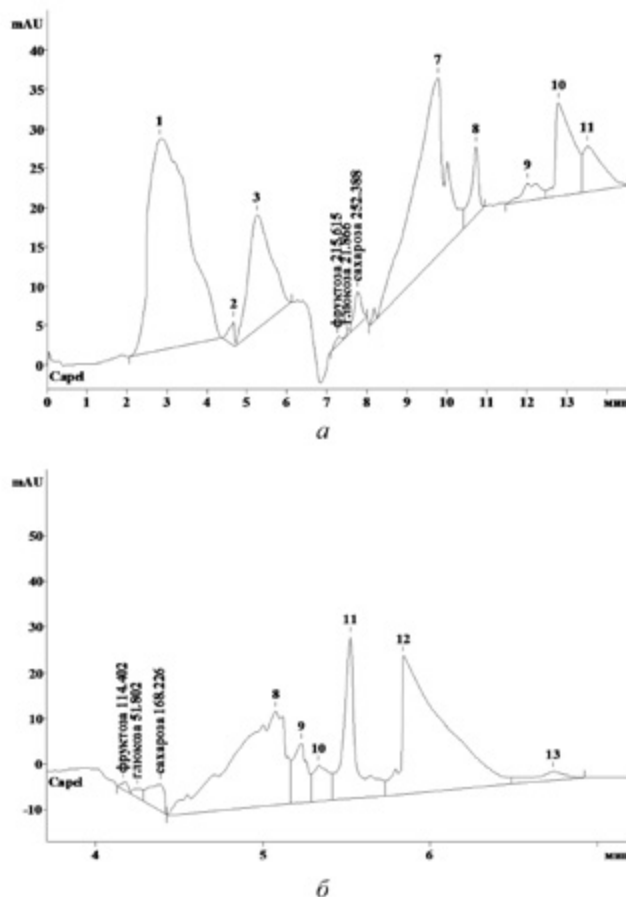


Рисунок 3. Электрофореграммы плодов ОК при определении суммы свободных сахаров: а – сорт «Трофимовская»; б – сорт «Галерит»

Figure 3. Electrophoregrams of OK fruits when determining the amount of free sugars: a – the variety «Trofimovskaya»; b – grade «Galerit»

количественно, на первом этапе работы проводили определение суммы БАВ исследуемых групп в плодах ОК изучаемых сортов в пересчете на абсолютно сухое сырье с целью выбора объектов с максимальным и минимальным содержанием. Результаты представлены в таблице 1. Метрологическая характеристика результатов исследования приведена в таблице 2.

Установлено, что наибольшее содержание суммы свободных АК наблюдается у сорта «Нивелена», а наименьшее – выявлено у сорта «Трофимовская». Данные таблицы 1 показывают, что наибольшее содержание суммы полисахаридов и сахаров выявлено для сорта «Трофимовская», а наименьшее – отмечено у сорта «Галерит». Наибольшее содержание суммы свободных органических кислот наблюдается у сорта «Нивелена», а наименьшее – у сорта «Рябиновая». Сахарно-кислотный индекс (СКИ) плодов ОК изучаемых сортов варьировал от 0,9 до 2,01, что свидетельствует об их принадлежности к группе кислых по существующей градации [1, с. 15].

Таблица 1. Содержание суммы БАВ в плодах ОК различных сортов в пересчете на абсолютно сухое сырьё, %

Table 1. The content of the sum of BAS in fruits OK different varieties in terms of absolutely dry raw materials, %

| №  | Сорт                        | Сумма свободных АК | Сумма свободных и связанных сахаров | Сумма свободных органических кислот |
|----|-----------------------------|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1  | «Столичная»                 | 1,398±0,147        | 19,898±5,441                        | 11,426±0,035                        |
| 2  | «Галерит»                   | 1,900±0,217        | 12,372±1,156                        | 11,441±0,074                        |
| 3  | «Рябиновая»                 | 1,181±0,131        | 12,604±0,995                        | 9,310±0,146                         |
| 4  | «Ботаническая любительская» | 1,803±0,368        | 12,393±2,201                        | 13,362±0,074                        |
| 5  | «Ботаническая»              | 1,511±0,032        | 21,116±0,623                        | 11,620±0,038                        |
| 6  | «Трофимовская»              | 0,848±0,023        | 24,275±1,523                        | 12,100±0,076                        |
| 7  | «Студенческая»              | 1,209±0,228        | 14,506±0,308                        | 16,084±0,186                        |
| 8  | «Ботаническая ароматная»    | 1,457±0,017        | 21,844±1,987                        | 12,375±0,075                        |
| 9  | «Красно-карминовая»         | 1,939±0,033        | 14,575±2,679                        | 12,784±0,074                        |
| 10 | «Нивелена»                  | 2,000±0,237        | 18,274±1,062                        | 18,090±0,075                        |

Полученные данные показали, что в целом качественный состав БАВ изучаемых сортов сходен между собой, что обусловлено принадлежностью растений к одному роду и виду *Hippocrepis rhamnoides*, но различается количественно. Однако, следует отметить, что различные сорта имеют свои фитохимические особенности. Так, с ростом содержания суммы свободных органических кислот в плодах в профиле данных БАВ появляется винная кислота (сорт «Нивелена»), практически отсутствующая в менее кислых сортах (сорт «Рябиновая»). В то же время содержание таких кислот, как сорбиновая и бензойная, у сорта «Рябиновая» на порядок выше по сравнению с сортом «Нивелена», а содержание щавелевой кислоты наоборот. Аминокислотный профиль представлен сходным качественным и количественным набором АК, что объясняется общим генотипом объектов исследования. Свободные сахара (глюкоза, фруктоза и сахароза) представлены во всех изучаемых сортах в различном количественном содержании. Самым сладким сортом является «Трофимовская», что согласуется с данными определения суммы свободных и связанных сахаров и значением СКИ (таблица 3).

Таблица 2. Метрологическая характеристика результатов исследования (P=95%, n=5)

Table 2. Metrological characteristics of the research results (P=95%, n=5)

| $\bar{x}$                              | $s^2$    | $s$      | $s_{\bar{x}}$ | $\Delta x$ | $\Delta \bar{x}$ | $\bar{\epsilon}$ |
|----------------------------------------|----------|----------|---------------|------------|------------------|------------------|
| Сумма свободных АК, %                  |          |          |               |            |                  |                  |
| 2,056117                               | 0,029255 | 0,17104  | 0,069827      | 0,439574   | 0,212653         | 10,34246         |
| Сумма свободных органических кислот, % |          |          |               |            |                  |                  |
| 16,09176                               | 0,02097  | 0,1448   | 0,06476       | 0,40256    | 0,18004          | 1,1188           |
| Сумма свободных и связанных сахаров, % |          |          |               |            |                  |                  |
| 21,84405                               | 19,28911 | 4,391936 | 1,793001      | 11,28728   | 5,047977         | 23,10916         |

Таблица 3. Показатели сахаро-кислотного индекса плодов ОК изучаемых сортов

Table 3. Indicators of the sugar-acid index of fruits OK studied varieties

| № п/п | Сорт                        | СКИ (среднее значение) |
|-------|-----------------------------|------------------------|
| 1     | «Столичная»                 | 1,74                   |
| 2     | «Галерит»                   | 1,08                   |
| 3     | «Рябиновая»                 | 1,35                   |
| 4     | «Ботаническая любительская» | 0,93                   |
| 5     | «Ботаническая»              | 1,82                   |
| 6     | «Трофимовская»              | 2,01                   |
| 7     | «Студенческая»              | 0,90                   |
| 8     | «Ботаническая ароматная»    | 1,77                   |
| 9     | «Краснокарминовая»          | 1,14                   |
| 10    | «Нивелена»                  | 1,01                   |

Для детального изучения специфического профиля БАВ данных групп проведено исследование методом КЭ на отмеченных сортах. Результаты определения в пересчете на абсолютно сухое сырьё приведены в таблицах 4–6.

Таблица 4. Результаты исследования профиля органических кислот в плодах ОК методом КЭ

Table 4. The results of the study of the profile of organic acids in fruits OK method KE

| № п/п | Органическая кислота | Содержание кислоты, % |                 |
|-------|----------------------|-----------------------|-----------------|
|       |                      | Сорт «Рябиновая»      | Сорт «Нивелена» |
| 1     | Щавелевая            | 0,0646                | 0,4077          |
| 2     | Фумаровая            | Менее 0,005*          | Менее 0,005     |
| 3     | Янтарная             | Менее 0,05            | Менее 0,05      |
| 4     | Яблочная             | 12,4116               | 14,7762         |
| 5     | Лимонная             | 0,2906                | 0,4408          |
| 6     | Пропионовая          | Менее 0,1             | Менее 0,1       |
| 7     | Молочная             | Менее 0,12            | Менее 0,12      |
| 8     | Бензойная            | 0,1076                | 0,0110          |
| 9     | Сорбиновая           | 0,2584                | 0,0992          |
| 10    | Винная               | Менее 0,005           | 1,3333          |
| 11    | Уксусная             | Менее 0,1             | Менее 0,1       |
| 12    | Муравьиная           | Менее 0,15            | Менее 0,15      |
| 13    | Масляная             | Менее 0,05            | Менее 0,05      |
| 14    | Молочная             | Менее 0,12            | Менее 0,12      |
| Всего |                      | 13,1328               | 17,0682         |

Примечание: \* – предел обнаружения.

Note: \* – detection limit.



Таблица 5. Результаты исследования профиля свободных сахаров в плодах ОК методом КЭ

Table 5. Profile Study Results free sugars in fruits OK method CE

| № п/п | Сахара   | Содержание сахара, % |                     |
|-------|----------|----------------------|---------------------|
|       |          | Сорт «Галерит»       | Сорт «Трофимовская» |
| 1     | Глюкоза  | 0,1093               | 0,0450              |
| 2     | Фруктоза | 0,2513               | 0,4724              |
| 3     | Сахароза | 0,3606               | 0,5511              |
| Всего |          | 0,7212               | 1,0685              |

Таблица 6. Результаты исследования профиля АК в плодах ОК методом КЭ

Table 6. The results of the study of the profile of AK in fruits OK method CE

| № п/п | АК                    | Содержание АК, % |                     |
|-------|-----------------------|------------------|---------------------|
|       |                       | Сорт «Нивелена»  | Сорт «Трофимовская» |
| 1     | Аргинин               | 1,0798           | 0,9785              |
| 2     | Лизин*                | 0,4518           | 0,3487              |
| 3     | Тирозин               | 0,2314           | 0,2024              |
| 4     | Фенилаланин*          | 0,6501           | 0,6073              |
| 5     | Гистидин              | 0,2755           | 0,2587              |
| 6     | Лейцин* + Изолейцин*  | 1,0248           | 0,8885              |
| 7     | Метионин*             | 0,0882           | 0,1125              |
| 8     | Валин*                | 0,6721           | 0,5623              |
| 9     | Пролин                | 0,5509           | 0,4386              |
| 10    | Треонин*              | 0,4738           | 0,4274              |
| 11    | Серин                 | 0,4958           | 0,4161              |
| 12    | Аланин                | 0,5950           | 0,5623              |
| 13    | Глицин                | 0,4297           | 0,3824              |
| 14    | Цистин                | 0,2645           | 0,5398              |
| 15    | Глутаминовая кислота  | 2,6335           | 2,2944              |
| 16    | Аспарагиновая кислота | 3,0522           | 2,3843              |
| Всего |                       | 12,9691          | 11,4042             |

Примечание: \* – незаменимая АК.

Note: \* - irreplaceable AK.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведено исследование профиля БАВ (свободных органических кислот и сахаров, а также свободных и связанных АК) плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом капиллярного электрофореза. В целом, качественный состав БАВ изучаемых сортов сходен между собой, но различается количественно. Проведено определение суммы свободных органических кислот, АК, свободных и связанных сахаров. Выявлены сорта с максимальным и минимальным содержанием исследуемых групп БАВ. По СКИ плоды ОК изучаемых сортов относятся к кислым.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Зубарев Ю. А. Итоги и задачи селекции облепихи в Сибири на современном этапе. *Достижения науки и техники АПК*. 2008; 7: 12–16.
2. Букштынов А. Д., Трофимов Т. Т., Ермаков Б. С. и др. Облепиха. М.: Изд-во: *Лесная промышленность*. 1978: 192 с.
3. Тринеева О. В. Комплексное исследование содержания и специфического профиля биологически активных веществ плодов облепихи крушиновидной. Воронеж: *Издательский дом ВГУ*. 2016: 224 с.
4. Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». СПб.: *ООО «Веда»*. 2006: 212 с.
5. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Дмитриева А. В. Определение аминокислот в плодах облепихи крушиновидной различных способов консервации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2014; 4(9): 63–68.
6. Тринеева О. В., Казьмина М. А., Сливкин А. И. Определение суммы полисахаридов и восстанавливающих моносахаридов в плодах облепихи крушиновидной различных способов консервации. *Материалы 6-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2016»*. Воронеж, 21–23 апреля. 2016: 547–551.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. М., 2015; 2: 1004. Available at: [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_1/HTML/](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/)
8. Тринеева О. В., Сафонова И. И., Сливкин А. И., Сафонова Е. Ф. Органические кислоты в плодах облепихи крушиновидной. *Фармация*. 2013; 7: 7–10.

## REFERENCES

1. Zubarev Yu. A. Results and objectives of the selection of sea buckthorn in Siberia at the present stage. *Achievements of science and technology of agriculture*. 2008; 7: 12–16 (In Russ.).
2. Buktshynov A. D., Trofimov T. T., Ermakov B. S. et al. Oblepika. M.: Publishing house: *Lesnaya promyshlennost' – Forest industry*. 1978: 192 p. (In Russ.).
3. Trineeva O. V. Comprehensive study of the content and specific profile of the biologically active substances of the sea-buckthorn fruits. Voronezh: *VSU Publishing House*. 2016: 224 p. (In Russ.).
4. Komarova N. V., Kamencev Ya. S. Practical guidance on the use of capillary electrophoresis systems «Capel». SPb.: *LLC Veda*. 2006: 212 p. (In Russ.).
5. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Dmitrieva A. V. Determination of amino acids in the fruits of sea buckthorn buckwheat various methods of preservation. *Drug Development & Registration*. 2014; 4(9): 63–68 (In Russ.).
6. Trineeva O. V., Kaz'mina M. A., Slivkin A. I. Determination of the amount of polysaccharides and reducing monosaccharides in the fruits of sea buckthorn buckwheat various methods of preservation. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Scientific and Methodological Conference «Pharmaceutical Education-2016»*. Voronezh, April 21–23. 2016: 547–551 (In Russ.).
7. Russian Federation State Pharmacopoeia XIII ed. M., 2015; 2: 1004. Available at: [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_1/HTML/](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/) (in Russ.).
8. Trineeva O. V., Safonova I. I., Slivkin A. I., Safonova E. F. Organic acids in the fruits of sea buckthorn. *Pharmacy*. 2013; 7: 7–10 (In Russ.).

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-43-57  
УДК 615.074

## КЛЕТОЧНЫЕ НОСИТЕЛИ КАК СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР)

О. В. Тринева<sup>1\*</sup>, А. Д. Халахакун<sup>1</sup>, А. И. Сливкин<sup>1</sup><sup>1</sup> – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская пл., 1

\*Контактное лицо: Тринева Ольга Валерьевна. E-mail: trineevaov@mail.ru

Статья получена: 26.10.2018. Статья принята к печати: 11.01.2019

### Резюме

**Введение.** Системы доставки лекарственных средств (СДЛС) определяются как системы, которые доставляют оптимальное количество лекарственного средства (ЛС) к целевой мишени, повышают эффективность лечения и уменьшают неблагоприятные последствия. Регулирование скорости высвобождения ЛС и доведение на конкретные ткани, где необходимы действующие вещества, являются основными целями СДЛС. Разработка систем для целенаправленной, органоспецифичной и контролируемой доставки лекарственных, профилактических и диагностических средств представляет собой в настоящее время актуальную область исследования для фармации и медицины. Особый интерес уделяется актуальной проблеме возрастания частоты проявлений побочных действий лекарственных препаратов (ЛП). Побочное действие ЛП, их малая эффективность нередко объясняются труднодоступностью препаратов непосредственно в мишень.

**Текст.** В настоящее время адресной доставкой химиотерапевтических веществ и СДЛС полностью изменяется тактика и подходы в медикаментозном лечении рака, позволяющие понижать побочные эффекты препарата и в целом увеличивать эффективность курса лечения. В настоящей работе приведено обобщение и систематизация сведений об адресных СДЛС противоопухолевого действия, описанных в научной литературе и используемых в фармации и медицине. Большинство рассмотренных в данном обзоре методов получения клеточных форм токсичных ЛС пока находится на стадии разработки, а некоторые методы постепенно находят практическое применение за рубежом в медицине и др. областях. Винкристин (VCR) и винбластин (VBL) являются наиболее широко используемыми и эффективными ЛС в химиотерапевтической практике. Несмотря на их эффективность против различных онкологических заболеваний, имеется ряд вредных побочных действий, которые ограничивают широкое применение этих препаратов.

**Заключение.** Существует возможность использования клеточных носителей (КН) в качестве системы доставки VCR и VBL. В научных публикациях пока отсутствуют данные о применении КН для инкапсулирования VCR и VBL. Поэтому актуальны исследования, посвященные возможности применения КН для уменьшения побочных эффектов, улучшения эффективности и разработки лекарственных форм доставки VCR и VBL в патологические очаги. Данная тематика в настоящее время активно разрабатывается сотрудниками кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета Воронежского госуниверситета.

**Ключевые слова:** направленный транспорт лекарственных веществ, клеточные носители, системы доставки лекарственных средств, винкристин, винбластин.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Тринева О. В., Халахакун А. Д., Сливкин А. И. Клеточные носители как системы доставки противоопухолевых лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 43–57.

## CELL CARRIERS AS SYSTEMS OF DELIVERY OF ANTITUMOR DRUGS (REVIEW)

O. V. Trineeva<sup>1\*</sup>, A. J. Halahakoon<sup>1</sup>, A. I. Slivkin<sup>1</sup><sup>1</sup> – Voronezh State University, 1, University Sq., Voronezh, 394006, Russia

\*Corresponding author: Olga V. Trineeva. E-mail: trineevaov@mail.ru

Received: 26.10.2018. Accepted: 11.01.2019

### Abstract

**Introduction.** Drug delivery systems are defined as systems that deliver the optimal amount of a drug to a target target, increase the effectiveness of treatment, and reduce adverse effects. Regulation of the rate of release of drugs and bringing to specific tissues where active ingredients are needed are the main objectives of drug delivery systems. The development of systems for targeted, organ-specific and controlled delivery of medicinal, prophylactic and diagnostic agents is currently a relevant area of research for pharmacy and medicine. Of particular interest is the actual problem of increasing the frequency of manifestations of side effects of drugs. The side effect of drugs, their low efficiency is often explained by the inaccessibility of drugs directly to the target.

**Text.** Currently, targeted delivery of chemotherapeutic agents and drug delivery systems has completely changed the tactics and approaches in the drug treatment of cancer, allowing to reduce the side effects of the drug and generally increase the effectiveness of the course of treatment. This paper summarizes and systematizes information about targeted systems for drug delivery of antitumor activity, described in the scientific literature and used in pharmacy and medicine. Most of the methods for obtaining cellular forms of toxic drugs discussed in this review are still at the development stage, and some methods are gradually finding practical application abroad in medicine and other fields. Vincristine (VCR) and vinblastine (VBL) are the most widely used and effective drugs in chemotherapeutic practice. Despite their effectiveness against various oncological diseases, there are a number of harmful side effects that limit the widespread use of these drugs.

**Conclusion.** There is the possibility of using cellular carriers as a VCR and VBL delivery system. In scientific publications, there is still no data on the use of cellular carriers for encapsulating VCR and VBL. Therefore, relevant studies are devoted to the possibility of using cellular carriers to reduce side effects, improve efficiency, and develop dosage forms for the delivery of VCR and VBL to pathological foci. This topic is currently being actively developed by members of the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology, Pharmaceutical Faculty, Voronezh State University.

**Keywords:** directional transport of medicinal substances, cellular carriers, drug delivery systems, vincristine, vinblastine.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Trineeva O. V., Halahakoon A. J., Slivkin A. I. Cell carriers as systems of delivery of antitumor drugs. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 43–57.

## ВВЕДЕНИЕ

Системы доставки лекарственных средств (СДЛС) определяются как системы, которые доставляют оптимальное количество лекарственного средства (ЛС) к

целевой мишени, повышают эффективность лечения и уменьшают неблагоприятные последствия [1]. Регулирование скорости высвобождения ЛС и адресная их доставка к патологическим тканям и органам являют-

ся основными целями СДЛС. СДЛС предназначены для контролирования концентрации ЛС, необходимой для тканей-мишеней.

Разработка систем для целенаправленной, органоспецифичной и контролируемой доставки лекарственных, профилактических и диагностических средств, представляет собой в настоящее время актуальную область исследования для фармации и медицины. Особый интерес уделяется актуальной проблеме возрастания частоты проявлений побочных действий лекарственных препаратов (ЛП): аллергических реакций, токсического действия больших доз, появления устойчивости на терапевтическую дозу, угнетения иммунитета. Побочное действие ЛП, их малая эффективность нередко объясняются трудной доступностью препаратов непосредственно в мишень.

Целью настоящей работы является обобщение и систематизация сведений об адресных СДЛС противоопухолевого действия, описанных в научной литературе и используемых в фармации и медицине.

### Классификация СДЛС

СДЛС можно разделить на три типа: искусственные, естественные (биологические) и гибридные. Также можно условно подразделять на три поколения на основе их хронологического появления и физического размера:

1. Носители лекарственных веществ (ЛВ) первого поколения (микрокапсулы, микросферы – размером от 1 мкм до 2 мкм), которые затем выпускают в виде различных лекарственных форм: порошков, таблеток, капсул, суспензий, эмульсий и др. В фармацевтической технологии микрокапсулирование стало применяться с конца 50-х – начала 60-х гг. XX века.
2. Носители ЛВ второго поколения (нанокапсулы, наночастицы, нанотрубы, дендримеры, липосомы, полимерные конъюгаты и др.) размером менее 1 мкм, объединенные в одну группу под названием коллоидных носителей. Нанокапсулы предназначены для парентерального введения вблизи определенного органа или ткани. Размер менее 100 нм [2–6].
3. Носители ЛВ третьего поколения с применением нанотехнологии, биотехнологии, генной инженерии и других областей науки (антитела [14–17], гликопротеиды [18, 19], клеточные маркеры и рецепторы [10, 20–23], вирусы и онколитические вирусы [24, 25] и др.), которые открывают новые возможности обеспечения высокого уровня избирательного действия и направленной доставки ЛВ.

СДЛС можно классифицировать по различным признакам, характеристикам, материалам, технологии получения, механизму действия и др. Например, липосомы можно классифицировать по строению на униламеллярные, олиголамеллярные, мультиламеллярные. Также по технологии и механизму: стелс-липосомы, стимулы чувствительности (рН-чувствительные липосомы, термочувствительные липосомы, фермент-чувствительные, магнитные поля – чувствительные, ультразвук-чувствительные и др.) [26], иммунолипосо-

мы, липосомы с контролируемым высвобождением и др. [27–29].

Адресная доставка лекарственных средств относится к преимущественным накоплениям препарата в целевой зоне, которая не зависит от способа и пути введения препарата. С другой стороны, таргетная терапия или таргетная медицина, означает специфическое взаимодействие между лекарственным средством и его рецептором на молекулярном уровне. Эффективные целевые системы доставки лекарств подразумевают четыре основных требования: сохранить терапевтическую дозу, избежать предварительной деградации препарата, направленность к мишени и высвобождение инкапсулированного препарата.

Технология, применяемая в СДЛС может быть классифицирована на три области: технология высвобождения, технология таргетинга (мишене-направленность) и контролируемость мембранного транспорта. В настоящее время доступны три контролируемых технологии высвобождения:

1. Периодическое высвобождение – постоянное количество препарата выделяется с постоянным интервалом времени;
2. Высвобождение по принципу обратной связи – препарат высвобождается по команде от физического сигнала;
3. Непрерывное высвобождение – лекарство высвобождается с постоянной скоростью.

Два типа таргетинговых технологий доступны. Один из них активного типа, в котором используется сигнальный пептид, реакции антиген-антитело и рецептор-лиганд. Другой тип пассивного таргетинга при эффекте повышенной проницаемости и удерживания (EPR – *enhanced permeation and retention*) вблизи злокачественных опухолей [12, 30–34].

Наноразмерные СДЛС (1–250 нм) способны изменить терапию различных заболеваний благодаря, в первую очередь, повышенной способности преодолевать различные биологические барьеры, увеличению времени полувыведения и адресной доставке ЛС. В настоящее время известны 5 нанотехнологических платформ, использующихся для адресной доставки лекарственных веществ, различающиеся по физико-химической структуре: полимеросомы, нанооболочки, дендримеры, полимерные мицеллы и конъюгаты полимер-лекарственное вещество [33, 35–36].

В настоящее время исследователи создали наносистемы, которые имеют несколько специфичных создаваемых функций в одном носителе (такие как, пролонгированность действия с контролем высвобождения, целенаправленность действия, стелс-липосомы, стимулочувствительные и др.), получившие название «мультифункциональные наносистемы для доставки ЛС» [37–39]. Ученые предполагают, что они могут значительно повысить эффективность многих терапевтических и диагностических протоколов.



### Липосомальные носители для доставки противоопухолевых препаратов

Липосомы, как лекарственная форма обладают многочисленными преимуществами, по сравнению с другими традиционными лекарственными формами. Наиболее значимые из них: уникальная способность доставки ЛП внутрь клеток; биосовместимость; отсутствие или минимальные возможности появления аллергических реакций (липосомы невидимки – стелс-липосомы); защита ЛП от деградации в организме; улучшение фармакокинетического профиля ЛП и повышение их терапевтической эффективности; снижение общетоксического действия на организм; универсальность и способность к модифицированию структуры липосомы к задаваемым ей специфическим свойствам [17, 29, 44–50].

### Наноносители в доставке противоопухолевых препаратов

Достижением нанотехнологии в доставке лекарств является способность манипулировать молекулами и надмолекулярными структурами с запрограммированными функциями. Наноллипосомы, полимерные мицеллы, нано-эмульсии [52], ниосомы, дендимеры, нанотрубы, наночастицы теперь называются «**нано-транспортными средствами – nanovehicles**» [53–54], а также программирование нескольких функций в одном носителе, превращает его в многофункциональный носитель, который называют «**мульти-функциональным носителем – multifunctional carrier**» [33, 39, 55–57].

В настоящее время с использованием нанотехнологии имеется огромная возможность для получения новых СДЛС, а также совершенствование уже существующих систем. К преимуществам наносистемных препаратов относятся [31, 33, 34, 53, 56, 58–62]:

- защита препарата от преждевременной деградации [33, 60];
- предотвращение преждевременного взаимодействия с биологической средой [33, 56, 63];
- увеличение абсорбции лекарства в специфичную ткань (например, солидные опухоли) [31, 33, 59];
- контролирование фармакокинетических свойств препарата и его распределения в ткани [31, 58, 59, 62];
- улучшение внутриклеточного проникновения [31, 32, 62, 64];
- возможность преодолевать множественную лекарственную устойчивость опухолей (магнитные наночастицы, иммунолипосомы, наноллипосомы и др.) [61, 65–69].

Некоторые исследователи применяли СДЛС (липосомы, наночастицы, мицеллы и др.) для противоопухолевых терпено-индольных алкалоидов (ТИА) – винкристина сульфата (VCR) и винбластина сульфата (VBL) с целью повышения эффективности, биодоступности и снижения побочного действия с помощью це-

ленаправленной доставки препарата. В таблице 1 приведена краткая информация о некоторых системах, которые применялись для доставки VCR и VBL.

### Клеточные носители (КН) в доставке ЛС

СДЛС на основе клеток наиболее близки к идеальным системам доставки. Биологические носители, такие как форменные элементы крови и др. аутологичные клетки, могут обойти иммунные барьеры и защитные системы в организме и обеспечить ряд преимуществ, включая длительное время циркуляции, хорошую способность к биологическому разложению, наличие поверхностных лигандов и гибкую морфологию, приблизительное постоянство физических характеристик всех носителей и легкость манипулирования их свойствами и др. Среди систем доставки на основе клеток можно выделить две категории:

1. Трансдуцированные клетки (с определенными генами или векторами);
2. Клеточные носители, которые могут быть загружены ЛС или терапевтическими средствами. В этой категории особо интересны клетки-носители, которые могут высвобождать содержащееся ЛС в кровотоке или на выбранных участках, или могут нацеливать ЛС на другие соответствующие клетки в организме.

К настоящему времени исследованными клеточными носителями являются клетки бактерий и животные клетки. Бактериальные клетки использовались в качестве препаратов неживых клеточных оболочек из грамотрицательных клеток, лишенных цитоплазматического содержимого, при сохранении морфологии и поверхностных антигенных структур [84]. Различные клетки были трансдуцированы выбранными генами и с разными векторами. Обычно перенос гена осуществляют для введения гена, экспрессирующего флуоресцентный белок, для отслеживания поведения клетки *in vivo* или для коррекции генетического дефекта (то есть мутации или деления гена) или для того, чтобы сделать клетку-мишень восприимчивой к действию выбранного ЛС.

### Аутологичные клетки крови, как носители ЛС

Аутологичные клетки (*autologous cells*) [греч. *autos* – сам и *logos* – разум, слово, мысль] – это клетки, взятые от определенного конкретного организма, культивированные, возможно генетически модифицированные и вновь введенные в организм-донор. Эритроциты, как известно, являются универсальными природными носителями у всех млекопитающих, птиц, членистоногих и др. видов, выполняющими жизненно важную транспортную функцию доставки кислорода в клетки. Эритроциты – это врожденные природные транспортеры в организме. В начале 70-х гг. XX века были попытки использовать эритроциты (собственные клетки крови) в качестве носителей ЛС [7, 85–92]. Основной проблемой, возникающей при использовании биоразлагаемых материалов или естественных кле-

Таблица 1. Некоторые системы доставки терпено-индольных алкалоидов (ТИА)

Table 1. Some delivery systems of terpene-indole alkaloids (TIA)

| Материал и тип                                                      | Авторы   | Форма и препараты                                                                                                                                                                      | Размер     | Применения                                                                                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Poly(lactic-co-glycolic acid)<br>PLGA\PEG<br>(Полиэтиленгликоль)    | [70]     | Фолиевая кислота и пептид конъюгирован PLGA-PEG бифункциональные наночастицы                                                                                                           | ~250 нм    | MCF-7 cell                                                                                                                                                                |
|                                                                     | [71]     | Декстран сульфат-PLGA гибридные наночастицы – VCR DS-(PLGA/NP)-VCR                                                                                                                     | ~128 нм    | MCF-7/ADR (Модель клеток рака молочной железы с множественной лекарственной устойчивостью)                                                                                |
|                                                                     | [37]     | Многофункциональные PLGA-PEG-PS-нано-образование с VCR                                                                                                                                 | ~95 нм     | MCF-7/ADR                                                                                                                                                                 |
|                                                                     | [46]     | Дистеароил фосфатидилэтаноламина-ПЭГ-липосомы (DSPE-PEG)-VCR                                                                                                                           | ~100 нм    | RM-1 простаты опухолевых клеток; DBA/2 мышей; мышей BDF1                                                                                                                  |
|                                                                     | [72]     | Декстран сульфат-твердые липидные наночастицы комплекс –VCR                                                                                                                            | 100~169 нм | MCF-7                                                                                                                                                                     |
| Липосомы                                                            | [47]     | VCR liposome injection (Marqibo®) сфингомиелин/холестерин (SM/Chol) нанолипосомы – VCR                                                                                                 | ~100 нм    | Rag2M мышей; неходжкинские лимфомы; глиобластомы; лимфому из клеток мантии; бигль собака                                                                                  |
|                                                                     | [73]     | Фосфолипон 100H/холестерин/PEG2000 -VCR                                                                                                                                                | 110~130 нм | Мыши                                                                                                                                                                      |
|                                                                     | [74]     | Сфингомиелин/липосомы холестерина (SM/Chol) – VCR                                                                                                                                      | ~115±25 нм | Опухолевые клетки P388 у мышей и человеческие опухолевые клетки A431                                                                                                      |
|                                                                     | [24, 75] | Дистеароилфосфатидилхолин (DSPC)/холестерин – VCR                                                                                                                                      | 0,1~2 мкм  | клетки лейкоза L1210 у мышей                                                                                                                                              |
|                                                                     | [76]     | Яичный сфингомиелин (ESM) / холестерин / PEG2000-керамиды / кверцетин (72,5: 17,5: 5: 5) липосом – VCR                                                                                 | –          | клетки MDA-MB-231                                                                                                                                                         |
|                                                                     | [77]     | Анти-HER2-иммунолипосомы [Chol-(DSPC)-(PEG-DSPE)- anti-HER2 scFv F5] липосом – VBL                                                                                                     | 76~102 нм  | <i>in vitro</i> на линии HER2-гиперэкспрессией карциномы клетки 2009 молочной железы человека SKBR3 и BT474-M2 клетки; <i>in vivo</i> BT474-M2 ксенотрансплантаты у мышей |
| Мульти-функциональные липосомы                                      | [78]     | Таргетинговые конъюгаты полиэтиленimina-полиэтиленгликоля-холестерина (CHOL-PEG2000-PEI) и вапроотида сукцината D-α-токоферил полиэтиленгликоля 1000 (TPGS1000-VAP) – VNB/ Тетраандрин | ~ 100 нм   | Клетки глиомы и стволовые клетки глиомы                                                                                                                                   |
| pH-чувствительные липосомы                                          | [79]     | Дирахидоилфосфохолин (DAPC)/ dibehenoylphosphocholine (DBPC) системе – VCR                                                                                                             | ~ 100 нм   | <i>In vitro</i>                                                                                                                                                           |
| Магнитные липосомы                                                  | [80]     | Магнитные липосомы из димиристоилфосфатидилхолин\димиристоилтриметиламмоний пропан \ холестерин \ 1,2-димиристоил-Sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин -VBL                                    | 105~267 нм | B16F10 клетки меланомы <i>in vivo</i> у мышей                                                                                                                             |
| Эмульсия                                                            | [81]     | Субмикронная эмульсия, VCR-олеиновая кислота ионный комплекс (VCR-OA)                                                                                                                  | 145~170нм  | MCF-7 клетки мышей                                                                                                                                                        |
| Наночастицы                                                         | [82]     | Поли(бутилцианоакрилат) наночастицы изменены внешне с Pluronic® F127                                                                                                                   | –          | Raji клетки (клетки из культивируемых клеток линии лимфобластных человека, полученные от пациента с лимфомой Беркитта)                                                    |
| Трансферсомы (везикулярные системы для трансдермальной доставки ЛС) | [49]     | VCR – трансферсомы                                                                                                                                                                     | ~63 нм     | Мыши                                                                                                                                                                      |
| Ниосомы (везикулы из неионногенных ПАВ)                             | [71]     | Наносомальный – VCR                                                                                                                                                                    | –          | Мыши                                                                                                                                                                      |
| Наночастицы                                                         | [83]     | Наночастицы бычьего сывороточного альбумина конъюгированного с фолиевой кислотой [FA-BSANPs – VBL]                                                                                     | 156,6 нм   | Новые обобщающие исследование <i>in vitro, in vivo</i>                                                                                                                    |

ток в качестве носителей ЛС является то, что они будут удалены из организма с помощью ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС) [86]. Но при помощи современных технологических подходов, таких как нанотех-

нологии, биотехнологии, иммунологии можно найти решения данных проблем. Например, пегилирование (PEGylation) мембраны эритроцитов делает их невидимыми для макрофагов [75].

Системы доставки, в которых используются собственные клетки организма, наиболее выгодны с точки зрения биологической совместимости, а также технологически и экономически. Среди них в качестве транспортных средств предполагается использование эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. Отдельным направлением, сформировавшимся в результате изучения возможности транспортировки ЛС к патологическому очагу, является разработка систем доставки, в которых в качестве носителей используются естественные контейнеры – форменные элементы крови человека или животных, непокрытые соответствующими антителами к клеткам-мишеням [42]. Методы, предполагающие использование аутологичных клеток крови для модификации их свойств с целью создания внутриклеточного депо препарата и осуществления направленного транспорта, объединяют под общим названием «**экстракорпоральная фармакотерапия**». Получаемые при этом клетки обозначаются термином «**фармакоциты**» [93].

Эритроциты, как и другие КН, могут быть модифицированы для улучшения фармакокинетики и фармакодинамики многих ЛС [87, 88, 90, 94–97]. Для многих ЛС было продемонстрировано успешное инкубирование препаратов как внутрь эритроцитов, так и на внешнюю поверхность, включая противовоспалительные, антимикробные, антитромботические, противоопухолевые, ферменты, гормоны, белки и др. [87–90, 94, 98–100].

### Эритроциты как система доставки ЛС

Первые попытки по загрузке химических веществ в эритроцитах были сделаны в 1953 г. Гардосом, который пытался загрузить АТФ в «пост-гемолитические плазменные мембраны эритроцитов «эритроцитарные тени» – *erythrocyte ghosts*» [42]. В 1959 г. Марсден и Остлинг сообщили о накоплении декстрана с молекулярной массой от 10 до 250 кДа, в пост-гемолитические плазменные мембраны эритроцита (ПГПМЭ). Четырнадцать лет спустя Garret M. Ihler et al. успешно инкапсулировал β-глюкозидазу и β-галактозидазу в эритроцитах, а также Zimmermann et al. в 1973 г. впервые опубликовали отчеты о загрузке терапевтических агентов в ПГПМЭ в целях доставки, и термин «носители эритроцитов» был использован в первый раз в 1979 г., чтобы описать препараты, которые загружали в эритроциты [86].

Доставка ЛВ с помощью эритроцитов становится все более популярной областью с постепенным перемещением из лаборатории в клинику [87]. В последние годы было опубликовано несколько обзоров, которые хорошо иллюстрируют события и различные области применения эритроцитарных систем [89, 90]. С позиции экстракорпоральной фармакотерапии, направленный транспорт ЛВ эритроцитами представляет собой наиболее перспективный способ использования самых многочисленных клеток крови – эритроцитов, с целым рядом желательных морфологических и физио-

логических характеристик. Эритроциты могут быть использованы в качестве носителей в двух направлениях [94, 96, 100]:

- ✓ Доставка к органу/ткани-мишени. Используется для таргетинга только мембрана («тени») эритроцитов. Наиболее эффективны такие КН при опухолевых заболеваниях печени, селезенки (модифицированные эритроциты захватываются и лизируются макрофагами этих органов) и легких (модифицированные эритроциты секвистрируются к капиллярах малого круга кровообращения, что обеспечивает повышенную концентрацию ЛВ в патологическом очаге). Их получают путем вымывания цитоплазмы клетки гипотоническим раствором, и после введения препарата в клетку, форму эритроцитов восстанавливают. Такие эритроциты называются пост-гемолитическими плазменными мембранами эритроцитов «*erythrocytes ghost*».
- ✓ Для непрерывного или пролонгированного высвобождения ЛВ из эритроцита, могут быть использованы в виде непрерывной или пролонгированной системы высвобождения.

Существуют различные методы для инкапсуляции ЛС в эритроциты. Они остаются в циркулирующем кровотоке на длительные периоды времени (до 120 дней) и высвобождают захваченные ЛВ с медленной и постоянной скоростью.

Целенаправленная доставка «таргетинг» ЛС к РЭС (макрофаги, печеночные клетки Купфера, альвеолярные макрофаги легкого, моноциты периферической крови и сосудистые эндотелиальные клетки) или другие органы, или ткани путем различных манипуляций (внешнего магнитного поля, ультразвука и др.) [107, 108] – еще одна важная стратегия, использующая эритроциты в качестве носителей [109, 110]. Значительная часть эритроцитов-носителей, которые подверглись некоторым структурным изменениям в процессе инкапсуляции, будут задерживаться органами РЭС, главным образом печенью и селезенкой, в течение короткого периода времени после введения в организм. Следовательно, часть инкапсулированного препарата быстро истощается в РЭС. Эта стратегия подходит для лечения конкретных болезненных состояний, в том числе печеночных опухолей и метастаз.

*Преимущества и недостатки эритроцитов как КН* [106, 109, 111]. *Преимущества:*

- ✓ Высокая степень биосовместимости, особенно когда аутологичные клетки используются для инкапсулирования ЛС в качестве носителя, и в результате полной биоразлагаемости КН отсутствуют токсичные продукты.
- ✓ Препараты, инкапсулированные в эритроцитах, не проявляют их фармакологические и токсикологические эффекты, пока не достигнут РЭС, что значительно уменьшает появление частоты побочных действий. Это значимо в случае применения препаратов с выраженной токсичностью, таких как противоопухолевые, аминогликозидные антибиотики и др. [96].



- ✓ Малая вероятность появления нежелательных иммунных реакций против инкапсулированных препаратов.
- ✓ При инкапсулировании антинеопластических средств в КН (эритроциты) предоставляется существенная защита организма от нежелательных эффектов от этих препаратов.
- ✓ Возможность пролонгирования действия препаратов, так как КН (эритроциты) могут циркулировать в кровотоке значительно долгое время.
- ✓ КН могут предоставить защиту против инактивации для инкапсулированного ЛС от эндогенных факторов.
- ✓ Возможность модификации фармакокинетических и фармакодинамических параметров препарата.
- ✓ Возможность поддержания постоянной терапевтической дозы на протяжении длительного периода, значительное увеличение интервала дозирования препарата.
- ✓ Возможность инкапсулирования относительно большого количества препарата в малые объемы эритроцитов.
- ✓ К недостаткам относятся:
- ✓ Основными проблемами, возникающими при использовании биоразлагаемых материалов или натуральных клеток как переносчиков ЛВ, заключается в том, что они элиминируются в естественных условиях по РЭС, в результате изменения структуры КН. Но этот недостаток можно устранить при помощи разработанной оптимальной технологии инкапсулирования, позволяющей сохранить морфологические и физико-химические параметры эритроцитов, близкими к физиологическим.
- ✓ Возможно быстрое высвобождение инкапсулированных ЛС. Но этот недостаток можно устранить при помощи различных линкеров (конъюгация ЛП с белковым вектором может быть осуществлена с помощью полиэтиленгликолевого или полипептидного линкера).
- ✓ Необходимость специальных условий для сохранения инкапсулированных КН (температура, pH среды, время хранения).

При использовании эритроцитов в качестве носителя для ЛС нужно уделять внимание некоторым факторам, таким как: возможность эритроцитов пройти через капилляры патологического очага, возможность целенаправленной доставки, возможность улучшения биосовместимости и минимализация токсичности инкапсулированного препарата, возможность минимализировать потерю инкапсулированного ЛС до достижения целевого места, возможность высвобождения инкапсулированного препарата с постоянной скоростью или контролируемым высвобождением.

Т. П. Генинг в своем автореферате «эритроциты млекопитающих в направленном транспорте БАВ» отмечает, что органоспецифичность клеточных носителей, полученных из форменных элементов крови, не

покрытых соответствующими антителами к органу мишени, будет определяться в первую очередь свойствами форменных элементов, способностью лейкоцитов мигрировать в очаг воспаления, эритроцитов фиксироваться эритрофагоцитирующими клетками, в основном печени и селезенки, способностью тромбоцитов к адгезии на поврежденных участках (внутренний слой артерии или вены) сосуда.

### Основные методы инкапсулирования ЛВ в эритроцитах

Для инкапсулирования ЛВ или других БАВ применяются различные методы (рисунок 1).



Рисунок 1. Методы включения (инкапсулирования) ЛВ в эритроциты [86, 94, 98, 100, 110]

Figure 1. Methods of incorporation (encapsulation) of LP in erythrocytes [86, 94, 98, 100, 110]

В их числе: физические (метод электрического импульса), химические (химическая пертурбация эритроцитов или мембран) и осмотические методы (гипотонический гемолиз, гипотоническое разведение, гипотонический лизис с предварительным набуханием и др.) [86, 87, 94, 105, 110].

### Метод гипотонического лизиса [86, 94, 98, 100, 109, 110]

Является самым распространенным из вышеперечисленных методов. Известны три вариации процедур гипотонического лизиса: метод гипотонического разведения, метод предварительного гипотонического набухания до выпуклости и метод гипотонического диализа. Эти процедуры основаны на физико-химических особенностях эритроцитов. Сам метод основан на способности эритроцитов к претерпеванию обратимого набухания в гипотоническом растворе. Эритроциты имеют исключительную способность к обратимым изменениям формы с или без сопровождающего изменение объема и для обратимой деформации под напряжением. Увеличение объема приводит к первоначальному изменению формы от двояковыпуклой к сферической. Это изменение связано с отсутствием избыточной мембраны; следовательно, площадь поверхности клетки фиксирована. Клетки приобретают сферическую форму для размещения дополнитель-

ного объема, сохраняя при этом постоянную площадь поверхности. Прирост объема составляет примерно 25–50%. В этот момент (как раз перед лизисом клеток), некоторые переходные поры 200–500 Å генерируются на мембране. После лизиса клеток, клеточное содержание истощается. Остаток называется пост-гемолитическими плазменными мембранами эритроцита. Через образовавшиеся поры вещества поступают из внешней среды внутрь эритроцитов (рисунок 2). При восстановлении тоничности раствора до исходного уровня, целостность поврежденной мембраны эритроцитов может восстанавливаться.

### Гипотоническое разведение (Hypotonic dilution)

Гипотоническое разведение было первым методом для инкапсуляции химических веществ в эритроциты и является самым простым и быстрым. Тоничность раствора восстанавливается путем добавления гипертонического буфера. Полученную смесь затем центрифугируют, супернатант отбрасывают и осадок промывают изотоническим буферным раствором [94]. Основные недостатки этого метода включают низкую эффективность инкапсулирования препаратов (1–8%) и значительную потерю гемоглобина и других компонентов клетки. Этот метод является быстрым и простым, особенно для препаратов с низкой молекулярной массой. Гипотоническое разбавление используют для загрузки ферментов, таких как β-галактозидаза, β-глюкозидаза, аспарагиназа [90, 95] и аргиназа, а также глюкокортикоидов, таких как дексаметазон [95], бронхорасширяющего средства – сальбутамола. Eva Pitt *et al.* использовали модифицированный метод гипотонического разведения для инкапсулирования ЛВ в эритроциты, что позволило увеличить эффективность % лекарственной загрузки до 30 с 35–50% восстановлением клеток.

### Метод предварительного гипотонического набухания (Hypotonic pre-swelling) [86, 94, 98, 100, 110]

Этот метод впервые был разработан М. С. Reches-teiner в 1975 г и изменен Jenner *et al.* для инкапсулирования ЛВ. Методика основана на контролируемом набухании эритроцитов в гипотоническом буферном растворе. Эритроциты набухают в гипотоническом растворе (0,6% NaCl) при 0 °C 5 мин до 150% от нормального объема, при этом эритроциты не повреждаются. Потом набухшие эритроциты центрифугируют при низких оборотах. Супернатант отбрасывают и повторно проводят набухание один раз, и клетки затем осаждают. Лизис обнаруживают исчезновением четкой границы между клеточной фракцией и супернатантом после центрифугирования. Тоничность клеточной смеси восстанавливается в точке лизиса путем добавления вычисленного количества гипертонического буфера. Затем клеточную суспензию инкубируют при 37 °C гипотоническим раствором препарата для инкапсулирования, после восстанавливают тоничность раствора для восстановления цельности эритроцитов (рисунок 3).

Этот метод проще и быстрее, чем другие методы, наносит минимальное повреждение клеткам. Препараты, инкапсулированные в эритроциты с использованием этого метода: аспарагиназа, циклофосфамид, кортизол-21-фосфат, антитрипсин, метронидазол, левотириксин, метотрексат, инсулин, эналаприлат и изониазид и др.

Компания EryDel SpA является собственником технологии «Red Cell Loader» – полностью автоматизированного прикроватного биомедицинского оборудования «EryDex System» для инкапсуляции эритроцитов методом гипотонического предварительного набухания, разработанного в 1998 г. Magnani *et al.* [91]. Система EryDex (EDS) используется для загрузки дексаметазона натрия фосфата (DSP) в аутологичные эритро-

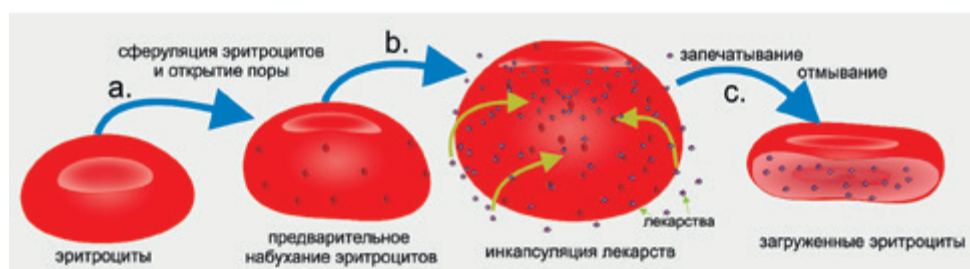


Рисунок 2. Основные этапы метода гипотонического лизиса эритроцитов [3, 86, 94].

а – эритроциты помещают в солевой раствор с пониженной ионной силой; б – лизис; предшествует набухание клеток до достижения критического объема и давления. При этом мембрана эритроцита лопается с образованием пор, которые в зависимости от условий могут иметь размеры от десятков ангстрем до 1,0–2,0 мкм; в – при восстановлении тоничности раствора до исходного уровня (0,9%) целостность поврежденной мембраны эритроцитов восстанавливается

Figure 2. The main stages of the method of hypotonic lysis of erythrocytes [3, 86, 94]. a

a – Erythrocytes are placed in saline with reduced ionic strength; b – lysis; preceded by swelling of the cells to achieve a critical volume and pressure. At the same time, the erythrocyte membrane bursts with the formation of pores, which, depending on the conditions, can range in size from tens of angstroms to 1.0–2.0 μm; c – When restoring the tonicity of the solution to the initial level (0.9%), the integrity of the damaged erythrocyte membrane is restored

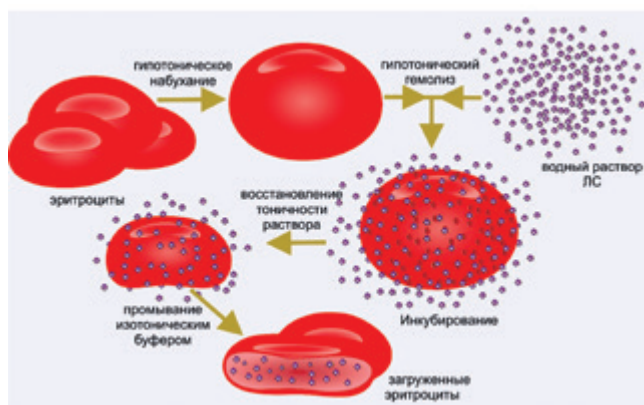


Рисунок 3. Схема основного этапа метода предварительного гипотонического набухания [7, 86, 94]

Figure 3. Scheme of the main stage of the method of preliminary hypotonic swelling [7, 86, 94]

циты, создавая конечный продукт EDS (EDS-EP), который вводится один раз в месяц пациенту. Компания утверждает, что EDS был использован у 204 пациентов в клинических исследованиях и не был связан с типичными побочными эффектами кортикостероидов, несмотря на длительное применение [112].

### Метод гипотонического диализа [86, 87, 94, 98, 100, 110]

В процессе изотонизации получают буферную суспензию эритроцитов со значением гематокрита 70–80% и помещают в стандартную диализную сумку с 10–20 кратным объемом гипотонического буфера. Смесь перемешивают медленно в течение 2 часов. Тоничность диализной сумки восстанавливается путем прямого добавления расчетного количества гипертонического буфера в окружающую среду или путем замены окружающей среды. Препарат может быть загружен либо растворением в изотоническом буфере в начале процедуры, либо путем добавления препарата в диализную сумку после завершения перемешивания. Нагруженные клетки имеют тот же период полураспада циркуляции, что и у нормальных клеток. Кроме того, этот метод имеет высокую эффективность инкапсулирования, около 30–50%, восстановления клетки 70–80%, высокую нагрузочную способность и возможности автоматизации и контроля переменных процесса [86]. В настоящее время существует полная автоматизированная система для инкапсулирования эритроцитов. В 2006 г. компания ERYTECH Pharma разрабатывала аппарат под названием «ERYcaps», который обеспечивает инкапсулирование эритроцитов ЛС из стандартного упакованного эритроцита, поставляемого банками крови, с соблюдением GMP. Путем централизованного производственного процесса можно обрабатывать объем 250–350 мл упакованных эритроцитов, и процедура занимает примерно 3 часа с созданием нагруженных клеток, способных продлить период полураспада активных макромолекул [91].

Elena Zocchi et al. провели исследования на печени, направляя эритроциты, инкапсулированные доксорубицином, для понятия возможности повышения терапевтического индекса препарата в мышинной метастатической модели [87]. Исследование было предпринято, чтобы определить, являются ли печень и легкие органами-мишенями для препарата, может ли привести к увеличению противоопухолевой активности против метастазов, локализованных в этих органах. При инкапсулировании доксорубицина в эритроцитах, они применяли метод гипотонического диализа, и для высвобождения инкапсулированного ЛС применили изотонический метод высвобождения. При проведении экспериментов авторами обнаружено, что доксорубин, инкапсулированный в эритроциты при помощи глутаральдегида (в настоящее время запрещен для введения в состав ЛП), при внутривенном введении препарата существенно повышает печеночное и легочное поглощение у мышей. В результате этой процедуры доказано, что нацеливание и концентрирование в печени до 70% от введенной дозы, по сравнению с 6%, когда вводился свободный препарат. Легочное поглощение также увеличилось с 1–6% от введенной дозы.

### Метод электро-инцерции или электро-инкапсуляции [86, 94, 98, 100, 110]

В 1973 году Zimmermann et al. пытался опробовать электрический импульсный метод к инкапсуляции биоактивных молекул. Также данный метод известен как электропорация, он основан на наблюдении за электрическим током, приводящим к необратимым изменениям в мембране эритроцитов. В 1977 г. Yow Tsong и Kinosita предложили использовать переходной электролиз для генерации желательной проницаемости мембраны для загрузки ЛС в эритроциты. Сущность метода заключается в том, что суспензию эритроцитов вместе с включаемым веществом в изотоническом растворе помещают в пульсирующее электрическое поле напряженностью до 20 кВ/см при длительности импульсов от нано- до микросекунд. Превышение трансмембранного потенциала критической величины 1 В приводит к временному образованию пор в клеточной мембране. В соответствующей среде перфорация клеток идет без гемолиза, позволяя готовить эритроцитарные носители, длительно живущие in vivo. Преимуществом метода является возможность инкапсулировать нерастворимые в цитоплазме компоненты.

### Метод эндоцитозной загрузки [86, 94, 98, 100, 110]

Этот метод описал Schrier et al. в 1975 г. Метод основан на том, что под действием определенных фармакологических агентов происходит инвагинация участка мембраны эритроцита с последующим обра-



зованием в цитоплазме мембранных пузырьков с внеклеточным содержимым. Многие ЛП также способны включаться внутрь эритроцитов и по обычным транспортным механизмам.

В результате экспериментальных исследований учёные обнаружили, что включение ЛП в клеточные носители имеет ряд ценных преимуществ. Это прежде всего целенаправленная доставка ЛС в определенные органы и ткани с созданием в них высокой терапевтической концентрации, что значительно снижает возможность возникновения различных побочных реакций от проникновения препаратов в здоровые органы. Ряд ЛС при парентеральном введении связывается с белками, что исключается при включении их в «транспортёрщики». Препараты при обычных методах введения практически всегда изменяют выраженность иммунологических процессов в организме. В настоящее время исследователи фокусируют свое внимание на инкапсуляции противоопухолевых препаратов в эритроцитах или наноэритросомах (*nanoerythrocytes*) [106, 113–116], эритроциты как переносчики циркулируют *in vivo* в сердечно-сосудистой системе, с возможностью целенаправленной доставки к органам и тканям (печень и селезенка), и возможностью нести большее количество инкапсулированных препаратов.

Zhiguang Wu et al. [108] показали в своем исследовании, что магнитные наночастицы можно инкапсулировать (погружать) в эритроциты методом гипотонически разбавленного инкапсулирования при минимальном повреждении клеточной мембраны в эритроцитах, и при использовании внешнего магнитного поля и ультразвуковых манипуляций управлять инкапсулированными эритроцитами. Это доказывает, что метод можно применять *in vivo* и *in vitro* в биомедицинской области [108].

Aaron C. Anselmo et al. [117] в проведенных исследованиях показали, что сферические наночастицы полистирола – NPs (200 или 500 нм диаметром), адсорбированного на поверхности эритроцитов (NPs-RBC), способны в высокой степени накапливаться легче, чем свободные наночастицы, минуя печень и селезенку. Эти методы могут применяться для получения наночастицы более биоразлагаемой с возможностью ее применения в качестве носителя доставки противоопухолевых ЛС при лёгочном раке.

Che-Ming J. Hu et al. [118] в проведенных исследованиях создали системы полимерных наночастиц, замаскированных на поверхности эритроцитов для пролонгированной циркуляции в кровотоке. Установили на основе нелинейной модели элиминации первый очевидный период полураспада (то есть 50% частиц удаляются) мембраны эритроцита, покрытой наночастицами ПЭГ, равный 9,6 ч и 6,5 ч.

Независимо от фармакокинетических моделей, наночастицы, адсорбированные на поверхности мембраны (RBC-мембранное покрытие) имеют более длительный элиминационный полураспад, который

предполагает, что RBC-мембраны с покрытием превосходят в замедлении в естественном клиренсе по сравнению с обычным ПЭГ-стелс покрытием. Результаты этого исследования показывают возможности применения таких модификаций для защиты СДЛС и самого ЛС от разрушения РЭС. Mathieu Laurencin et al. [107] в проведенных экспериментах показали многофункциональность эритроцитов, покрытых магнитными наночастицами ( $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ ), и возможность применения для доставки контрастных агентов, противоопухолевых ЛС и др.

### Действие инкапсулированных эритроцитов на опухоли

Как рассматривалось в данном обзоре, КН обладают полезными свойствами, которые имеют важное значение при химиотерапии. В настоящее время при остром лимфобластном лейкозе применяются эритроциты в качестве носителя для L-аспергиназы. GRASPA™ [111, 119] является эритроцитарным препаратом, инкапсулированным L-аспергиназой, который применяют против острого лимфобластного лейкоза. Инкапсулированный в эритроциты адриамицин показывает значительно меньшую токсичность (кардиотоксичность) в химиотерапии [111].

Поверхностно модифицированные эритроциты могут использоваться в качестве целенаправленной доставки ЛС. Так же возможно использование таргетинговой доставки ЛС в органы ретикулоэндотелиальной системы на примере инкапсулированного актиномицина Д. 2-фтор-Ара-АМФ (флударабин) [120] является фторированным аналогом аденина, который является полезным при лечении хронической лимфоцитарной лейкемии. Инкапсуляция флударабина в человеческих эритроцитах *in vitro* приводит к пролонгации действия препарата до нескольких дней. Это свойство может быть использовано для медленного высвобождения в лечении злокачественной лимфомы.

Antonio De Flora et al. доказали, что инкапсулированный в человеческих эритроцитах 5-фтор-2'-5'-дезоксифосфат монофосфат (FdUMP) может быть использован в качестве биореактора для запрограммированного на адресную доставку противоопухолевого препарата 5-фтор-2V-дезоксифосфата (FdUrd) в печень.

Fazoil I. Ataulakhanov et al. доказали, что рубомицин, инкапсулированный в эритроциты обладает выраженным противоопухолевым эффектом против модели Р388 опухолевых клеток у крысы.

Ферро-жидкость с неорганическими наночастицами магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) с сильно выраженными магнитными свойствами, заполняемая в эритроциты с различными ЛС (противовоспалительные, противоопухолевые и др.) на этапе производства, позволяет использовать подобные лекарственные формы в качестве магнитно-управляемых при приложении внешнего магнитного поля [109, 110].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время адресной доставкой химиотерапевтических веществ и СДЛС полностью изменяется тактика и подходы в медикаментозном лечении рака, позволяющие понижать побочные эффекты препарата и в целом увеличивать эффективность курса лечения. Большинство рассмотренных в данном обзоре методов получения клеточных форм токсичных ЛС пока находится на стадии разработки, а некоторые методы постепенно находят практическое применение за рубежом в медицине и др. областях.

VCR и VBL являются наиболее широко используемыми и эффективными ЛС в химиотерапевтической практике. Несмотря на их эффективность против различных онкологических заболеваний, имеется ряд вредных побочных действий, которые ограничивают широкое применения этих препаратов. Как рассмотрено в данном обзоре, существует возможность использования КН в качестве системы доставки VCR и VBL. В научных публикациях пока отсутствуют данные о применении КН для инкапсулирования VCR и VBL. Поэтому актуальны исследования, посвященные возможности применения КН для уменьшения побочных эффектов, улучшения эффективности и разработки лекарственных форм доставки VCR и VBL в патологические очаги. Данная тематика в настоящее время активно разрабатывается сотрудниками кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tsuchida K. Drug Delivery Systems for Cancer Treatment // Encyclopedia of Cancer / ed. M. Schwab. – Elsevier. 2002; 1: 1160–1162.
2. Полковникова Ю. А., Леньшин А. С., Середин П. В. Исследования по разработке наночастиц с афобазолом на основе пористого кремния. *Биофармацевтический журнал*. 2017; 9(2): 43–47.
3. Полковникова Ю. А., Леньшин А. С., Середин П. В., Минаков Д. А. Адсорбция и десорбция лекарственных препаратов на наночастицы кремния. *Экология. Экономика. Информатика. Серия: Системный анализ и моделирование экономических и экологических систем*. 2017; 1(2): 448–452.
4. Полковникова Ю. А. Использование пористого кремния в качестве перспективного носителя лекарственных веществ. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2017; 4: 124–129.
5. Полковникова Ю. А. и др. Изучение процесса осаждения и высвобождения винпоцетина из системы адресной доставки лекарственных веществ на основе наночастиц пористого кремния. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2016; 3: 120–125.
6. Постнов В. Н., Наумывшева Е. Б., Королев Д. В., Галагудза М. М. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов. *Биотехносфера*. 2013; 6(30): 16–27.
7. Ивонин А. Г. и др. Направленный транспорт лекарственных препаратов: современное состояние вопроса и перспективы. *Известия Коми научного центра УрО РАН*. 2012; 1(9): 46–55.
8. Brannon-Peppas L., Blanchette J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004; 56: 1649–1659. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.033.
9. Feng N. et al. Delivery of vincristine sulfate-conjugated gold nanoparticles using liposomes: a light-responsive nanocarrier with enhanced antitumor efficiency. *International Journal of Nanomedicine*. 2015; 10: 3081–3095. DOI: 10.2147/IJN.S79550.
10. Tiwari G. et al. Drug delivery systems: An updated review. *Int. J. Pharm. Investig.* 2012; 2(1): 2–11. DOI: 10.4103/2230-973X.96920.
11. Liu Z. et al. Drug Delivery with Carbon Nanotubes for *In vivo* Cancer Treatment. *Cancer Research*. 2008; 68(16): 6652–6660. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1468.
12. Farokhzad O. C., Langer R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*. 2009; 3(1): 16–20. DOI: 10.1021/nn900002m.
13. Babu A. et al. Nanoparticle-Based Drug Delivery for Therapy of Lung Cancer: Progress and Challenges. *Journal of Nanomaterials*. 2013; 2013: 11 p. DOI: 10.1155/2013/863951.
14. Tolcher A. W. et al. A phase 1 study of anti-TGFβ receptor type-II monoclonal antibody LY3022859 in patients with advanced solid tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2017; 65(3): 589–595. DOI: 10.1007/s00280-017-3245-5.
15. Yamazaki N. et al. Phase 1 study of pembrolizumab (MK-3475; anti-PD-1 monoclonal antibody) in Japanese patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*. 2016; 34(3): 347–354. DOI: 10.1007/s00280-016-3237-x.
16. Terheyden P., Becker J. C. New developments in the biology and the treatment of metastatic Merkel cell carcinoma. *Current Opinion in Oncology*. 2017; 1. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000363.
17. Torchilin V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005; 4(2): 145–160. DOI: 10.1038/nrd1632.
18. Camacho K. M., Menegatti S., Mitragotri S. Low-molecular-weight polymer–drug conjugates for synergistic anticancer activity of camptothecin and doxorubicin combinations. *Nanomedicine*. 2016; 11(9): 1139–1151. DOI: 10.2217/nmm.16.33.
19. He R., Yin C. Trimethyl chitosan based conjugates for oral and intravenous delivery of paclitaxel. *Acta Biomaterialia*. 2017; February: 355–356. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.02.012.
20. Park J. W. et al. Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002; 8(4): 1172–1181.
21. Yang T. et al. Antitumor effect of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposomes against human breast cancer cells. *Pharmaceutical Research*. 2007; 24(12): 2402–2411. DOI: 10.1007/s11095-007-9425-y.
22. Onishi H. et al. CD24 Modulates Chemosensitivity of MCF-7 Breast Cancer cells. *Anticancer Research*. 2017; 37(2): 561–566.
23. Weissferdt A. et al. Expression of PD-1 and PD-L1 in thymic epithelial neoplasms. *Modern Pathology*. 2017: 1–8. DOI: 10.1038/modpathol.2017.6.
24. Gardeck A. M., Sheehan J., Low W. C. Immune and viral therapies for malignant primary brain tumors. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2017; 17(4): 457–474. DOI: 10.1080/14712598.2017.1296132.
25. Foreman P. M. et al. Oncolytic Virotherapy for the Treatment of Malignant Glioma. *Neurotherapeutics*. 2017: 1–12. DOI: 10.1007/s13311-017-0516-0.
26. Lee Y., Thompson D. H. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*. 2017: 1450. DOI: 10.1002/wnan.1450.
27. Baryshnikova M. A., Baryshnikov A. Y. Immunoliposomes and their targets // *Russian Journal of General Chemistry*. 2013; 83(12): 2565–2570.
28. Karanth H., Murthy R. S. R. pH-Sensitive liposomes-principle and application in cancer therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007; 59(4): 469–483. DOI: 10.1211/jpp.59.4.0001.
29. Weissig V., Weissig V. Liposomes Methods and Protocols Volume 1: *Pharmaceutical Nanocarriers: Methods in Molecular Biology*. V. 605. Totowa, NJ: Humana Press, 2010; 559.
30. Bae Y. H., Park K. Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *Journal of Controlled Release*. 2011; 153(3): 198–205.
31. Grobmyer S. R., Moudgil B. M., Grobmyer S. R., Moudgil B. M. Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols: *Methods in Molecular Biology*. V. 624. Totowa, NJ: Humana Press, 2010; 396.

32. Prokop A. Intracellular Delivery: Fundamentals and Applications: Fundamental Biomedical Technologies. V. 5. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011; 888.
33. De Villiers M. M. et al. Nanotechnology in Drug Delivery. New York, NY: Springer New York. 2009; 681.
34. Torchilin Vladimir P., de Villiers M. M., Aramwit P., Kwon G. S. Nanotechnology for Intracellular Delivery and Targeting. *Nanotechnology in Drug Delivery*. New York, NY: Springer New York, 2009: 313–346.
35. Alexis F. et al. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*. 2008; 5(4): 505–515. DOI: 10.1021/mp800051m.
36. Riggio C. et al. Nano-Oncology: Clinical Application for Cancer Therapy and Future Perspectives. *Journal of Nanomaterials*. 2011; 2011: 1–10. DOI: 10.1155/2011/164506.
37. Zhang P. et al. Multifunctional nanoassemblies for vincristine sulfate delivery to overcome multidrug resistance by escaping P-glycoprotein mediated efflux. *Biomaterials*. 2011; 32(23): 5524–5533. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.022.
38. Pan U. N. [et al. Protein-Based Multifunctional Nanocarriers for Imaging, Photothermal Therapy, and Anticancer Drug Delivery. *ACS applied materials & interfaces*. 2016. DOI: 10.1021/acsami.6b06099.
39. Torchilin V. P. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006; 58(14): 1532–1555. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.009.
40. Барсуков Л. И. Липосомы. *Соросовский образовательный журнал*. 1998; 10: 2–9.
41. Ткаченко Б. И. Функции клеток крови. Гемостаз. Регуляция кровотока. Основы трансфузиологии // Нормальная физиология человека. М.: Медицина. 2005: 309–345.
42. Швеи В. И. и др. От липосом семидесятых к нанобиотехнологии XXI века. *Российские Нанотехнологии*. 2008; 3(11–12): 52–66.
43. Akbarzadeh A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013; 8(1): 102. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102.
44. Elbayoumi T. A., Torchilin V. P. Current Trends in Liposome Research. *Liposomes Methods and Protocols*. V. 1: Pharmaceutical Nanocarriers / eds. V. Weissig, Department. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2010: 1–29.
45. Immordino M. L., Cattel L. Stealth Liposomes: Review of the Basic Science, Rationale and Clinical Applications, Existing and Potential Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. 2016; April: 297–315.
46. Cui J. et al. Development of Pegylated Liposomal Vincristine Using Novel Sulfobutyl Ether Cyclodextrin Gradient: Is Improved Drug Retention Sufficient to Surpass DSPE–PEG-Induced Drug Leakage. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 100(7): 2835–2848. DOI: 10.1002/jps.22496.
47. Silverman J. A., Deitcher S. R. (Vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2013; 71(3): 555–564. DOI: 10.1007/s00280-012-2042-4.
48. Vila-Caballer M. et al. A pH-sensitive stearyl-PEG-poly(methacryloyl sulfadimethoxine)-decorated liposome system for protein delivery: An application for bladder cancer treatment. *Journal of Controlled Release*. 2016; 238: 31–42. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.07.024.
49. Guo X., Szoka F. C. Steric stabilization of fusogenic liposomes by a low-pH sensitive PEG-dithio ester-lipid conjugate. *Bioconjugate chemistry*. 2001; 12(2): 291–300. DOI: 10.1021/bc000110v.
50. Zhang Y. Stealth Liposomes: the silent nanobombers. *Preclinical Formulation – Trends in Bio/Pharmaceutical Industry*. 2008; 4: 19–24.
51. Bawa R. FDA and Nano: Baby Steps, Regulatory Uncertainty and the Bumpy Road Ahead. *Handbook of Clinical Nanomedicine Law, Business, Regulation, Safety, and Risk* / eds. R. Bawa, G. F. Audette, B. E. Reese. – Boca Raton, FL: CRC Press, 2016: 339–384.
52. Singh Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2017; 252: 28–49. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.03.008.
53. Brewer E., Coleman J., Lowman A. Emerging Technologies of Polymeric Nanoparticles in Cancer Drug Delivery. *Journal of Nanomaterials*. 2011; 2011: 1–10. DOI: 10.1155/2011/408675.
54. Missailidis S. Anticancer-therapeutic. *West Sussex: A John Wiley & Sons, Ltd., Publication*. 2008: 410.
55. Fernandez-Fernandez A., Manchanda R., McGoron A. J. Theranostic applications of nanomaterials in cancer: Drug delivery, image-guided therapy, and multifunctional platforms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011; 165: 1628–1651. DOI: 10.1007/s12010-011-9383-z
56. Ochubiojo M. et al. Nanotechnology in Drug Delivery. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems* / ed. A. D. Sezer. – Rijeka, Croatia: InTech, 2012: 69–106. DOI: 10.5772/51384.
57. Niemirowicz K., Car H. Nanocarriers in modern drug delivery systems. *Chemik*. 2012; 66(8): 875–881.
58. Lim E. K. et al. Chitosan-based intelligent theragnosis nanocomposites enable pH-sensitive drug release with MR-guided imaging for cancer therapy. *Nanoscale research letters*. 2013; 8: 467. DOI: 10.1186/1556-276X-8-467.
59. Schäfer-Korting M. et al. Drug Delivery: Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010; 197: 506.
60. Peer D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*. 2007; 2(12): 751–760. DOI: 10.1038/nnano.2007.387.
61. Perche F., Torchilin V. P. Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting. *Journal of drug delivery*. 2013; 2013: 32 p. DOI: 10.1155/2013/705265.
62. Vlerken L. E., Vyas T. K., Amiji M. M. Poly(ethylene glycol)-modified Nanocarriers for Tumor-targeted and Intracellular Delivery. *Pharmaceutical Research*. 2007; 24(8): 1405–1414. DOI: 10.1007/s11095-007-9284-6.
63. Slivkin A. I. et al. DNA-Based hybrid liquid crystalline nano organometallic composites for targeted drug delivery in neutron capture therapy. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2017; 9(6): 74. DOI: 10.22159/ijpps.2017v9i6.17991.
64. Suh J. et al. PEGylation of nanoparticles improves their cytoplasmic transport. *International journal of nanomedicine*. 2007; 2(4): 735–741.
65. Acharya S., Sahoo S. K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011; 63(3): 170–183. DOI: 10.1016/j.addr.2010.10.008
66. Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Development Research*. 2006; 67(1): 55–60. DOI: 10.1002/ddr.20067.
67. Wanga C. et al. Folic acid-conjugated liposomal vincristine for multidrug resistant cancer therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 8(2): 118–127. DOI: 10.1016/j.ajps.2013.07.015.
68. Chomoucka J. et al. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research*. 2010; 62(2): 144–149. DOI: 10.1016/j.phrs.2010.01.014.
69. Peer D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*. 2007; 2(12): 751–760. DOI: 10.1038/nnano.2007.387.
70. Avendano C., Menéndez J. C. Anticancer drugs targeting tubulin and Microtubules. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs. Elsevier, Boulevard*. 2015: 359–387.
71. Ling G. et al. Development of novel self-assembled DS-PLGA hybrid nanoparticles for improving oral bioavailability of vincristine sulfate by P-gp inhibition. *Journal of Controlled Release*. 2010; 148(2): 241–248. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.08.010.
72. Aboutaleb E. et al. Improved brain delivery of vincristine using dextran sulfate complex solid lipid nanoparticles: optimization and in vivo evaluation. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2014; 102(7): 2125–2136. DOI: 10.1002/jbm.a.34890.
73. Zucker D. et al. Characterization of PEGylated nanoliposomes co-remotely loaded with topotecan and vincristine: Relating structure and pharmacokinetics to therapeutic efficacy. *Journal of Controlled Release*. 2012; 160(2): 281–289. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.10.003.
74. Leonetti C. et al. In vivo administration of liposomal vincristine sensitizes drug-resistant human solid tumors. *International Journal of Cancer*. 2004; 110(5): 767–774. DOI: 10.1002/ijc.20174.
75. Garratty G. Modulating the red cell membrane to produce universal/stealth donor red cells suitable for transfusion. *Vox sanguinis*. 2008; 94(2): 87–95. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2007.01003.x.
76. Wong M. Y., Chiu G. N. C. Liposome formulation of co-encapsulated vincristine and quercetin enhanced antitumor activity in a



- trastuzumab-insensitive breast tumor xenograft model. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2011; 7(6): 834–840.
77. Noble C. O. et al. Characterization of highly stable liposomal and immunoliposomal formulations of vincristine and vinblastine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2009; 64(4): 741–751. DOI: 10.1007/s00280-008-0923-3.
78. Li X. et al. Multifunctional targeting vinorelbine plus tetrandrine liposomes for treating brain glioma along with eliminating glioma stem cells. *Oncotarget*. 2016; 7(17). Available at: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/) (accessed: 12.02.2016).
79. Boman N. L. Optimization of the retention properties of vincristine in liposomal systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Biomembranes*. 1993; 1152(2): 253–258.
80. Dandamudi S., Campbell R. B. The drug loading, cytotoxicity and tumor vascular targeting characteristics of magnetite in magnetic drug targeting. *Biomaterials*. 2007; 28(31): 4673–4683. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.024.
81. Zhang T. et al. A novel submicron emulsion system loaded with vincristine-oleic acid ion-pair complex with improved anticancer effect: In vitro and in vivo studies. *International Journal of Nanomedicine*. 2013; 8: 1185–1196. DOI: 10.2147/IJN.S41775.
82. Tan R. et al. Preparation of vincristine sulfate-loaded poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles modified with pluronic F127 and evaluation of their lymphatic tissue targeting. *Journal of drug targeting*. 2014; 22(6): 509–517. DOI: 10.3109/1061186X.2014.897708.
83. Abid K. et al. Simultaneous determination of Vincristine and Vinblastine in *Vinca rosea* leaves by High Performance Thin Layer Chromatography. *International journal of drug development and research*. 2013; 5(3): 341–348.
84. Elbayoumi T. A., Torchilin V. P. Current Trends in Liposome Research // *Liposomes Methods and Protocols*. Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers / ed. V. Weissig, Department. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 2010: 1–29.
85. Sun Y. et al. Advances of blood cell-based drug delivery systems. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2017; 96: 115–128. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.07.021.
86. Gupta A. et al. Cell Based Drug Delivery System through Resealed Erythrocyte – A Review. *Blood Cells*. 2010; 2(1): 23–30.
87. Zocchi E. et al. Encapsulation of doxorubicin in liver-targeted erythrocytes increases the therapeutic index of the drug in a murine metastatic model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989; 86(6): 2040–2044.
88. Rossi L. et al. Engineering erythrocytes for the modulation of drugs and contrasting agents pharmacokinetics and biodistribution. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016; 106: 73–87. DOI: 10.1016/j.addr.2016.05.008.
89. Godfrin Y. Erythrocytes as a drug delivery system. *Innovations in Pharmaceutical Technology*. 2009; 28: 60–62.
90. Magnani M., Rossi L. Approaches to erythrocyte-mediated drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*. 2014; 11(5): 677–87. DOI: 10.1517/17425247.2014.889679.
91. Pierigè F. et al. Reengineering red blood cells for cellular therapeutics and diagnostics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2017: 1454. DOI: 10.1002/wnan.1454.
92. Sah A. K. et al. Resealed erythrocytes: A Novel carrier for drug targeting. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2011; 3(2): 550–565.
93. Горбачёв В. И., Зарубин М. В. Экстракорпоральная фармакотерапия: реалии и перспективы. Available at: <https://refdb.ru/look/2591162.html>. (accessed: 10.1.2017).
94. Magnani M., Landes R. Erythrocyte Engineering for Drug Delivery and Targeting. Texas, U.S.A.: *Eurekah.com*, 2002: 151.
95. Xu P., Wang R., Wang X. J. Ouyang Recent advancements in erythrocytes, platelets, and albumin as delivery systems. *OncoTargets and therapy*. 2016; 9: 2873–2884. DOI: 10.2147/OTT.S104691.
96. Villa C. H. et al. Red blood cells: Supercarriers for drugs, biologicals, and nanoparticles and inspiration for advanced delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016; 106: 88–103. DOI: 10.1016/j.addr.2016.02.007.
97. Wu Y. W., Goubran H., Seghatchian J., Burnouf T. Smart blood cell and microvesicle-based Trojan horse drug delivery: Merging expertise in blood transfusion and biomedical engineering in the field of nanomedicine. *Transfusion and Apheresis Science*. 2016; 54(2): 309–318. DOI: 10.1016/j.transci.2016.04.013.
98. Jadhav K. R. et al. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as drug carrier. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2012; 12(1): 79–88.
99. Villa C. H. et al. Erythrocytes as Carriers for Drug Delivery in Blood Transfusion and Beyond. *Transfusion medicine reviews*. 2017; 31(1): 26–35. DOI: 10.1016/j.tmr.2016.08.004.
100. Ravilla S. Erythrocytes as Carrier for Drugs, Enzymes and Peptides. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2012; 2(4): 166–176.
101. Википедия. Эритроциты. *Википедия*. Available at: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Эритроциты>. (accessed: 15.03.2017).
102. Ross M. H., Pawlina W. Blood. *A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*, 6<sup>th</sup> Edition / Ed. M. H. Ross, W. Pawlina. Wolter Kluwer, 2011: 270–313.
103. Muzykantov V. R. Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature. *Expert opinion on drug delivery*. 2010; 7(4): 403–427. DOI: 10.1517/17425241003610633.
104. Pierigè F., Serafini S., Rossi L., Magnani M. Cell-based drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2008; 60(2): 286–295.
105. Kumar A., Verma M., Jha K. Resealed Erythrocytes as a Carrier for Drug Targeting: A Review. *Thepharmajournal.Com*. 2011; 3(2): 550–565.
106. Patel R. P., Patel M. J., Patel N. F. An overview of resealed erythrocyte drug delivery. *Journal of Pharmacy Research*. 2009; 2(6): 1008–1012.
107. Laurencin M. et al. Human erythrocytes covered with magnetic core-shell nanoparticles for multimodal imaging. *Advanced healthcare materials*. 2013; 2(9): 1209–1212. DOI: 10.1002/adhm.201200384.
108. Zhiguang Wu et al. Turning erythrocytes into functional micromotors. *ACS Nano*. 2014; 8(12): 12041–12048. DOI: 10.1021/nn506200x.
109. Hamidi M. et al. Applications of carrier erythrocytes in delivery of biopharmaceuticals. *Journal of Controlled Release*. 2007; 118(2): 145–160. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.06.032.
110. Patel P. D. et al. Drug loaded erythrocytes: as novel drug delivery system. *Current pharmaceutical design*. 2008; 14(1): 63–70. DOI: 10.2174/138161208783330772.
111. Jangde R. An Overview of Resealed Erythrocyte for Cancer Therapy. *Asian J. Res. Pharm. Sci*. 2011; 1(4): 83–92.
112. EryDelSPA. EryDex System. *EryDelSPA*. Available at: [http://www.erydel.com/public/sitemin/Attest\\_study\\_start\\_up.pdf](http://www.erydel.com/public/sitemin/Attest_study_start_up.pdf). (accessed: 10.02.2017).
113. Banerjee N., Singh S. Nanoerythrocytes – Dawn of A New Era in Carrier Mediated Targeted Drug Delivery. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2013; 4(2): 436–455.
114. Hu C. M. J., Fang R. H., Zhang L. Erythrocyte-inspired delivery systems. *Advanced Healthcare Materials*. 2012; 1(5): 537–547.
115. Nangare K. A., Powar S. D., Payghan S. A. Nanoerythrocytes: Engineered Erythrocytes as a Novel Carrier for the Targeted Drug Delivery. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2016; 10(3): 231–233.
116. Saurabh K. V. et al. Review Article Drug Targeting By Erythrocytes: A Carrier System. 2013; 2(2): 144–156.
117. Anselmo A. C. et al. Option on Red Blood Cells. *ACS Nano*. 2013; 7(12): 11129–11137. DOI: 10.1021/nn404853z.
118. Hu C. J. et al. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108(27): 10980–10985. DOI: 10.1073/pnas.1106634108.
119. National Institute for Health Research (NIHR) Horizon Scanning Centre. Erythrocyte encapsulated asparaginase (GRASPA) for acute lymphoblastic leukaemia – second line. *National Institute for Health Research (NIHR) Horizon Scanning Centre*. 2015: 1–9.
120. Pierigè F. et al. Cytotoxic activity of 2-Fluoro-ara-AMP and 2-Fluoro-ara-AMP-loaded erythrocytes against human breast carcinoma cell lines. *International journal of oncology*. 2010; 37(1): 133–142. DOI: 10.3892/ijo.00000661.

## REFERENCES

1. Tsuchida K. Drug Delivery Systems for Cancer Treatment // Encyclopedia of Cancer / ed. M. Schwab. – Elsevier. 2002; 1: 1160–1162.
2. Polkovnikova Yu. A., Len'shin A. S., Seredin P. V. Research on the development of nanoparticles with afobazole based on porous silicon. *Biopharmaceutical journal*. 2017; 9(2): 43–47 (In Russ.).
3. Polkovnikova Yu. A., Len'shin A. S., Seredin P. V., Minakov D. A. Adsorption and desorption of drugs on silicon nanoparticles. *Ecology. Economy. Computer science. Series: System Analysis and Modeling of Economic and Ecological Systems*. 2017; 1(2): 448–452. (In Russ.).
4. Polkovnikova Yu. A. The use of porous silicon as a promising carrier of medicinal substances. *Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2017; 4: 124–129 (In Russ.).
5. Polkovnikova Yu. A. et al. Study of the process of precipitation and release of vinpocetine from the system of targeted drug delivery based on porous silicon nanoparticles. *Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2016; 3: 120–125 (In Russ.).
6. Postnov V. N., Naumysheva E. B., Korolev D. V., Galagudza M. M. Nanoscale carriers for drug delivery. *Biotechnosfera*. 2013; 6(30): 16–27 (In Russ.).
7. Ivonin A. G. et al. Directed transport of drugs: the current state of the issue and prospects. *Komi Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*. 2012; 1(9): 46–55 (In Russ.).
8. Brannon-Peppas L., Blanchette J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004; 56: 1649–1659. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.033.
9. Feng N. et al. Delivery of vincristine sulfate-conjugated gold nanoparticles using liposomes: a light-responsive nanocarrier with enhanced antitumor efficiency. *International Journal of Nanomedicine*. 2015; 10: 3081–3095. DOI: 10.2147/IJN.S79550.
10. Tiwari G. et al. Drug delivery systems: An updated review. *Int. J. Pharm. Investig.* 2012; 2(1): 2–11. DOI: 10.4103/2230-973X.96920.
11. Liu Z. et al. Drug Delivery with Carbon Nanotubes for *In vivo* Cancer Treatment. *Cancer Research*. 2008; 68(16): 6652–6660. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1468.
12. Farokhzad O. C., Langer R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*. 2009; 3(1): 16–20. DOI: 10.1021/nn900002m.
13. Babu A. et al. Nanoparticle-Based Drug Delivery for Therapy of Lung Cancer: Progress and Challenges. *Journal of Nanomaterials*. 2013; 2013: 11 p. DOI: 10.1155/2013/863951.
14. Tolcher A. W. et al. A phase 1 study of anti-TGF $\beta$  receptor type-II monoclonal antibody LY3022859 in patients with advanced solid tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2017; 65(3): 589–595. DOI: 10.1007/s00280-017-3245-5.
15. Yamazaki N. et al. Phase 1 study of pembrolizumab (MK-3475; anti-PD-1 monoclonal antibody) in Japanese patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*. 2016; 34(3): 347–354. DOI: 10.1007/s00280-016-3237-x.
16. Terheyden P., Becker J. C. New developments in the biology and the treatment of metastatic Merkel cell carcinoma. *Current Opinion in Oncology*. 2017; 1. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000363.
17. Torchilin V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005; 4(2): 145–160. DOI: 10.1038/nrd1632.
18. Camacho K. M., Menegatti S., Mitragotri S. Low-molecular-weight polymer–drug conjugates for synergistic anticancer activity of camptothecin and doxorubicin combinations. *Nanomedicine*. 2016; 11(9): 1139–1151. DOI: 10.2217/nnm.16.33.
19. He R., Yin C. Trimethyl chitosan based conjugates for oral and intravenous delivery of paclitaxel. *Acta Biomaterialia*. 2017; February: 355–356. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.02.012.
20. Park J. W. et al. Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002; 8(4): 1172–1181.
21. Yang T. et al. Antitumor effect of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposomes against human breast cancer cells. *Pharmaceutical Research*. 2007; 24(12): 2402–2411. DOI: 10.1007/s11095-007-9425-y.
22. Onishi H. et al. CD24 Modulates Chemosensitivity of MCF-7 Breast Cancer cells. *Anticancer Research*. 2017; 37(2): 561–566.
23. Weissferdt A. et al. Expression of PD-1 and PD-L1 in thymic epithelial neoplasms. *Modern Pathology*. 2017: 1–8. DOI: 10.1038/modpathol.2017.6.
24. Gardeck A. M., Sheehan J., Low W. C. Immune and viral therapies for malignant primary brain tumors // *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2017; 17(4): 457–474. DOI: 10.1080/14712598.2017.1296132.
25. Foreman P. M. et al. Oncolytic Virotherapy for the Treatment of Malignant Glioma. *Neurotherapeutics*. 2017: 1–12. DOI: 10.1007/s13311-017-0516-0.
26. Lee Y., Thompson D. H. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*. 2017: 1450. DOI: 10.1002/wnan.1450.
27. Baryshnikova M. A., Baryshnikov A. Y. Immunoliposomes and their targets. *Russian Journal of General Chemistry*. 2013; 83(12): 2565–2570.
28. Karanth H., Murthy R. S. R. pH-Sensitive liposomes-principle and application in cancer therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007; 59(4): 469–483. DOI: 10.1211/jpp.59.4.0001.
29. Weissig V., Weissig V. Liposomes Methods and Protocols Volume 1: *Pharmaceutical Nanocarriers: Methods in Molecular Biology*. V. 605. Totowa, NJ: Humana Press, 2010; 559.
30. Bae Y. H., Park K. Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *Journal of Controlled Release*. 2011; 153(3): 198–205.
31. Grobmyer S. R., Moudgil B. M., Grobmyer S. R., Moudgil B. M. Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. V. 624. Totowa, NJ: Humana Press, 2010; 396.
32. Prokop A. Intracellular Delivery: Fundamentals and Applications: Fundamental Biomedical Technologies. V. 5. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011; 888.
33. De Villiers M. M. et al. Nanotechnology in Drug Delivery. New York, NY: Springer New York. 2009; 681.
34. Torchilin Vladimir P., de Villiers M. M., Aramwit P., Kwon G. S. Nanotechnology for Intracellular Delivery and Targeting. *Nanotechnology in Drug Delivery*. New York, NY: Springer New York, 2009: 313–346.
35. Alexis F. et al. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*. 2008; 5(4): 505–515. DOI: 10.1021/mp800051m.
36. Riggio C. et al. Nano-Oncology: Clinical Application for Cancer Therapy and Future Perspectives. *Journal of Nanomaterials*. 2011; 2011: 1–10. DOI: 10.1155/2011/164506.
37. Zhang P. et al. Multifunctional nanoassemblies for vincristine sulfate delivery to overcome multidrug resistance by escaping P-glycoprotein mediated efflux. *Biomaterials*. 2011; 32(23): 5524–5533. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.022.
38. Pan U. N. [et al. Protein-Based Multifunctional Nanocarriers for Imaging, Photothermal Therapy, and Anticancer Drug Delivery // *ACS applied materials & interfaces*. 2016. DOI: 10.1021/acsami.6b06099.
39. Torchilin V. P. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006; 58(14): 1532–1555. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.009.
40. Barsukov L. I. Liposomes. *Soros Educational Journal*. 1998; 10: 2–9. (In Russ.).
41. Tkachenko B. I. Functions of blood cells. Hemostasis. Regulation of blood formation basics transfusiology. *Normal human physiology*. Moscow: Medicine. 2005: 309–345. (In Russ.).
42. Shvec V. I. et al. From the seventies liposomes to nanobiotechnology of the XXI century. *Russian Nanotechnologies*. 2008; 3(11–12): 52–66 (In Russ.).
43. Akbarzadeh A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013; 8(1): 102. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102.
44. Elbayoumi T. A., Torchilin V. P. Current Trends in Liposome Research. *Liposomes Methods and Protocols*. V. 1: Pharmaceutical Nanocarriers / eds. V. Weissig, Department. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2010: 1–29.
45. Immordino M. L., Cattel L. Stealth Liposomes: Review of the Basic Science, Rationale and Clinical Applications, Existing and Potential Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. 2016; April: 297–315.

46. Cui J. et al. Development of Pegylated Liposomal Vincristine Using Novel Sulfolbutyl Ether Cyclodextrin Gradient: Is Improved Drug Retention Sufficient to Surpass DSPE-PEG-Induced Drug Leakage. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 100(7): 2835–2848. DOI: 10.1002/jps.22496.
47. Silverman J. A., Deitcher S. R. (Vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2013; 71(3): 555–564. DOI: 10.1007/s00280-012-2042-4.
48. Vila-Caballer M. et al. A pH-sensitive stearyl-PEG-poly(methacryloyl sulfadimethoxine)-decorated liposome system for protein delivery: An application for bladder cancer treatment. *Journal of Controlled Release*. 2016; 238: 31–42. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.07.024.
49. Guo X., Szoka F. C. Steric stabilization of fusogenic liposomes by a low-pH sensitive PEG-diortho ester-lipid conjugate. *Bioconjugate chemistry*. 2001; 12(2): 291–300. DOI: 10.1021/bc000110v.
50. Zhang Y. Stealth Liposomes: the silent nanobombers. *Preclinical Formulation – Trends in Bio/Pharmaceutical Industry*. 2008; 4: 19–24.
51. Bawa R. FDA and Nano: Baby Steps, Regulatory Uncertainty and the Bumpy Road Ahead. *Handbook of Clinical Nanomedicine Law, Business, Regulation, Safety, and Risk* / eds. R. Bawa, G. F. Audette, B. E. Reese. – Boca Raton, FL: CRC Press, 2016: 339–384.
52. Singh Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2017; 252: 28–49. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.03.008.
53. Brewer E., Coleman J., Lowman A. Emerging Technologies of Polymeric Nanoparticles in Cancer Drug Delivery. *Journal of Nanomaterials*. 2011; 2011: 1–10. DOI: 10.1155/2011/408675.
54. Missailidis S. Anticancer-therapeutic. *West Sussex: A John Wiley & Sons, Ltd., Publication*. 2008: 410.
55. Fernandez-Fernandez A., Manchanda R., McGoron A. J. Theranostic applications of nanomaterials in cancer: Drug delivery, image-guided therapy, and multifunctional platforms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011; 165: 1628–1651. DOI: 10.1007/s12010-011-9383-z.
56. Ochubiojo M. et al. Nanotechnology in Drug Delivery. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems* / ed. A. D. Sezer. – Rijeka, Croatia: InTech, 2012: 69–106. DOI: 10.5772/51384.
57. Niemirowicz K., Car H. Nanocarriers in modern drug delivery systems. *Chemik*. 2012; 66(8): 875–881.
58. Lim E. K. et al. Chitosan-based intelligent theragnosis nanocomposites enable pH-sensitive drug release with MR-guided imaging for cancer therapy. *Nanoscale research letters*. 2013; 8: 467. DOI: 10.1186/1556-276X-8-467.
59. Schäfer-Korting M. et al. Drug Delivery: Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010; 197: 506.
60. Peer D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*. 2007; 2(12): 751–760. DOI: 10.1038/nnano.2007.387.
61. Perche F., Torchilin V. P. Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting. *Journal of drug delivery*. 2013; 2013: 32 p. DOI: 10.1155/2013/705265.
62. Vlerken L. E., Vyas T. K., Amiji M. M. Poly(ethylene glycol)-modified Nanocarriers for Tumor-targeted and Intracellular Delivery. *Pharmaceutical Research*. 2007; 24(8): 1405–1414. DOI: 10.1007/s11095-007-9284-6.
63. Slivkin A. I. et al. DNA-Based hybrid liquid crystalline nano organometallic composites for targeted drug delivery in neutron capture therapy. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2017; 9(6): 74. DOI: 10.22159/ijpps.2017v9i6.17991.
64. Suh J. et al. PEGylation of nanoparticles improves their cytoplasmic transport. *International journal of nanomedicine*. 2007; 2(4): 735–741.
65. Acharya S., Sahoo S. K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011; 63(3): 170–183. DOI: 10.1016/j.addr.2010.10.008.
66. Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Development Research*. 2006; 67(1): 55–60. DOI: 10.1002/ddr.20067.
67. Wanga C. et al. Folic acid-conjugated liposomal vincristine for multidrug resistant cancer therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 8(2): 118–127. DOI: 10.1016/j.ajps.2013.07.015.
68. Chomoucka J. et al. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research*. 2010; 62(2): 144–149. DOI: 10.1016/j.phrs.2010.01.014.
69. Peer D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*. 2007; 2(12): 751–760. DOI: 10.1038/nnano.2007.387.
70. Avendano C., Menéndez J. C. Anticancer drugs targeting tubulin and Microtubules. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs. Elsevier, Boulevard*. 2015: 359–387.
71. Ling G. et al. Development of novel self-assembled DS-PLGA hybrid nanoparticles for improving oral bioavailability of vincristine sulfate by P-gp inhibition. *Journal of Controlled Release*. 2010; 148(2): 241–248. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.08.010.
72. Aboutaleb E. et al. Improved brain delivery of vincristine using dextran sulfate complex solid lipid nanoparticles: optimization and in vivo evaluation. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2014; 102(7): 2125–2136. DOI: 10.1002/jbm.a.34890.
73. Zucker D. et al. Characterization of PEGylated nanoliposomes co-remotely loaded with topotecan and vincristine: Relating structure and pharmacokinetics to therapeutic efficacy. *Journal of Controlled Release*. 2012; 160(2): 281–289. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.10.003.
74. Leonetti C. et al. In vivo administration of liposomal vincristine sensitizes drug-resistant human solid tumors. *International Journal of Cancer*. 2004; 110(5): 767–774. DOI: 10.1002/ijc.20174.
75. Garratty G. Modulating the red cell membrane to produce universal/stealth donor red cells suitable for transfusion. *Vox sanguinis*. 2008; 94(2): 87–95. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2007.01003.x.
76. Wong M. Y., Chiu G. N. C. Liposome formulation of co-encapsulated vincristine and quercetin enhanced antitumor activity in a trastuzumab-insensitive breast tumor xenograft model. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2011; 7(6): 834–840.
77. Noble C. O. et al. Characterization of highly stable liposomal and immunoliposomal formulations of vincristine and vinblastine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2009; 64(4): 741–751. DOI: 10.1007/s00280-008-0923-3.
78. Li X. et al. Multifunctional targeting vinorelbine plus tetrandrine liposomes for treating brain glioma along with eliminating glioma stem cells. *Oncotarget*. 2016; 7(17). Available at: www.impactjournals.com/oncotarget/ (accessed: 12.02.2016).
79. Boman N. L. Optimization of the retention properties of vincristine in liposomal systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Biomembranes*. 1993; 1152(2): 253–258.
80. Dandamudi S., Campbell R. B. The drug loading, cytotoxicity and tumor vascular targeting characteristics of magnetite in magnetic drug targeting. *Biomaterials*. 2007; 28(31): 4673–4683. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.024.
81. Zhang T. et al. A novel submicron emulsion system loaded with vincristine-oleic acid ion-pair complex with improved anticancer effect: In vitro and in vivo studies. *International Journal of Nanomedicine*. 2013; 8: 1185–1196. DOI: 10.2147/IJN.S41775.
82. Tan R. et al. Preparation of vincristine sulfate-loaded poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles modified with pluronic F127 and evaluation of their lymphatic tissue targeting. *Journal of drug targeting*. 2014; 22(6): 509–517. DOI: 10.3109/1061186X.2014.897708.
83. Abid K. et al. Simultaneous determination of Vincristine and Vinblastine in Vinca rosea leaves by High Performance Thin Layer Chromatography. *International journal of drug development and reaserch*. 2013; 5(3): 341–348.
84. Elbayoumi T. A., Torchilin V. P. Current Trends in Liposome Research // Liposomes Methods and Protocols Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers / ed. V. Weissig, Department. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 2010: 1–29.
85. Sun Y. et al. Advances of blood cell-based drug delivery systems. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2017; 96: 115–128. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.07.021.



86. Gupta A. et al. Cell Based Drug Delivery System through Resealed Erythrocyte – A Review. *Blood Cells*. 2010; 2(1): 23–30.
87. Zocchi E. et al. Encapsulation of doxorubicin in liver-targeted erythrocytes increases the therapeutic index of the drug in a murine metastatic model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989; 86(6): 2040–2044.
88. Rossi L. et al. Engineering erythrocytes for the modulation of drugs and contrasting agents pharmacokinetics and biodistribution. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016; 106: 73–87. DOI: 10.1016/j.addr.2016.05.008.
89. Godfrin Y. Erythrocytes as a drug delivery system. *Innovations in Pharmaceutical Technology*. 2009; 28: 60–62.
90. Magnani M., Rossi L. Approaches to erythrocyte-mediated drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*. 2014; 11(5): 677–87. DOI: 10.1517/17425247.2014.889679.
91. Pierigè F. et al. Reengineering red blood cells for cellular therapeutics and diagnostics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2017; 1454. DOI: 10.1002/wnan.1454.
92. Sah A. K. et al. Resealed erythrocytes: A Novel carrier for drug targeting. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2011; 3(2): 550–565.
93. Gorbachyov V. I., Zarubin M. V. Ehkstrakorporal'naya farmakoterapiya: realii i perspektivy. Available at: <https://refdb.ru/look/2591162.html>. (accessed: 10.1.2017) (In Russ.).
94. Magnani M., Landes R. Erythrocyte Engineering for Drug Delivery and Targeting. Texas, U.S.A.: *Eurekah.com*, 2002: 151.
95. Xu P., Wang R., Wang X. J. Ouyang Recent advancements in erythrocytes, platelets, and albumin as delivery systems. *OncoTargets and therapy*. 2016; 9: 2873–2884. DOI: 10.2147/OTT.S104691.
96. Villa C. H. et al. Red blood cells: Supercarriers for drugs, biologicals, and nanoparticles and inspiration for advanced delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016; 106: 88–103. DOI: 10.1016/j.addr.2016.02.007.
97. Wu Y. W., Goubran H., Seghatchian J., Burnouf T. Smart blood cell and microvesicle-based Trojan horse drug delivery: Merging expertise in blood transfusion and biomedical engineering in the field of nanomedicine. *Transfusion and Apheresis Science*. 2016; 54(2): 309–318. DOI: 10.1016/j.transci.2016.04.013.
98. Jadhav K. R. et al. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as drug carrier. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2012; 12(1): 79–88.
99. Villa C. H. et al. Erythrocytes as Carriers for Drug Delivery in Blood Transfusion and Beyond. *Transfusion medicine reviews*. 2017; 31(1): 26–35. DOI: 10.1016/j.tmr.2016.08.004.
100. Ravilla S. Erythrocytes as Carrier for Drugs, Enzymes and Peptides. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2012; 2(4): 166–176.
101. Wikipedia. Red blood cells. *Wikipedia*. Available at: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Эритроциты>. (accessed: 15.03.2017).
102. Ross M. H., Pawlina W. Blood. *A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*, 6<sup>th</sup> Edition / Ed. M. H. Ross, W. Pawlina. Wolter Kluwer, 2011: 270–313.
103. Muzykantov V. R. Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature. *Expert opinion on drug delivery*. 2010; 7(4): 403–427. DOI: 10.1517/17425241003610633.
104. Pierigè F., Serafini S., Rossi L., Magnani M. Cell-based drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2008; 60(2): 286–295.
105. Kumar A., Verma M., Jha K. Resealed Erythrocytes as a Carrier for Drug Targeting: A Review. *Thepharmajournal.Com*. 2011; 3(2): 550–565.
106. Patel R. P., Patel M. J., Patel N. F. An overview of resealed erythrocyte drug delivery. *Journal of Pharmacy Research*. 2009; 2(6): 1008–1012.
107. Laurencin M. et al. Human erythrocytes covered with magnetic core-shell nanoparticles for multimodal imaging. *Advanced healthcare materials*. 2013; 2(9): 1209–1212. DOI: 10.1002/adhm.201200384.
108. Zhiguang Wu et al. Turning erythrocytes into functional micromotors. *ACS Nano*. 2014; 8(12): 12041–12048. DOI: 10.1021/nn506200x.
109. Hamidi M. et al. Applications of carrier erythrocytes in delivery of biopharmaceuticals. *Journal of Controlled Release*. 2007; 118(2): 145–160. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.06.032.
110. Patel P. D. et al. Drug loaded erythrocytes: as novel drug delivery system. *Current pharmaceutical design*. 2008; 14(1): 63–70. DOI: 10.2174/138161208783330772.
111. Jangde R. An Overview of Resealed Erythrocyte for Cancer Therapy. *Asian J. Res. Pharm. Sci*. 2011; 1(4): 83–92.
112. EryDelSPA. EryDex System. *EryDelSPA*. Available at: [http://www.erydel.com/public/sitemin/Attest\\_study\\_start\\_up.pdf](http://www.erydel.com/public/sitemin/Attest_study_start_up.pdf). (accessed: 10.02.2017).
113. Banerjee N., Singh S. Nanoerythrocytes – Dawn of A New Era in Carrier Mediated Targeted Drug Delivery. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2013; 4(2): 436–455.
114. Hu C. M. J., Fang R. H., Zhang L. Erythrocyte-inspired delivery systems. *Advanced Healthcare Materials*. 2012; 1(5): 537–547.
115. Nangare K. A., Powar S. D., Payghan S. A. Nanoerythrocytes: Engineered Erythrocytes as a Novel Carrier for the Targeted Drug Delivery. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2016; 10(3): 231–233.
116. Saurabh K. V. et al. Review Article Drug Targeting By Erythrocytes: A Carrier System. 2013; 2(2): 144–156.
117. Anselmo A. C. et al. Option on Red Blood Cells. *ACS Nano*. 2013; 7(12): 11129–11137. DOI: 10.1021/nn404853z.
118. Hu C. J. et al. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108(27): 10980–10985. DOI: 10.1073/pnas.1106634108.
119. National Institute for Health Research (NIHR) Horizon Scanning Centre. Erythrocyte encapsulated asparaginase (GRASPA) for acute lymphoblastic leukaemia – second line. *National Institute for Health Research (NIHR) Horizon Scanning Centre*. 2015: 1–9.
120. Pierigè F. et al. Cytotoxic activity of 2-Fluoro-ara-AMP and 2-Fluoro-ara-AMP-loaded erythrocytes against human breast carcinoma cell lines. *International journal of oncology*. 2010; 37(1): 133–142. DOI: 10.3892/ijo\_00000661.

# УРАЛЬСКАЯ НЕДЕЛЯ ЗДОРОВЬЯ

14-я специализированная выставка

**26-28**  
**марта**

Место проведения:

**ЦМТЕ**

(г. Екатеринбург, ул. Куйбышева, 44)

**ВХОД СВОБОДНЫЙ!**

**СПЕЦПРОЕКТ**  
**ЗДОРОВОЕ ДОЛГОЛЕТИЕ**  
**&ЗДОРОВЫЙ ОБРАЗ ЖИЗНИ**



УРАЛЬСКИЕ ВЫСТАВКИ

Тел. (343) 385-35-35

[www.uv66.ru](http://www.uv66.ru)



организатор:

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-59-65  
УДК 615.072; 615.222; 547.587.51

## ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТАНЦИИ 4,4'-ДИМЕТИЛ-7,7'-ЭТИЛЕНДИОКСИ-2Н-1-ДИБЕНЗОПИРАН-2,2'-ДИОНА

К. Б. Нгуен<sup>1\*</sup>, А. З. Абышев<sup>1</sup>

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

\*Контактное лицо: Нгуен Конг Банг. E-mail: nguyencongbang.ru@gmail.com

Статья получена: 05.10.2018. Статья принята к печати: 11.01.2019

### Резюме

**Введение.** Одной из наиболее перспективных синтетических соединений производных кумарина является иммунакор – 4,4'-диметил-7,7'-этилендиокси-2Н-1-дibenзопиран-2,2'-диона. В результате доклинических исследований показано, что перспективность его применения в медицинской практике в качестве иммуномодулятора для лечения и профилактики вторичных иммунодефицитных заболеваний.

**Цель.** Задача настоящей работы являются разработки методик ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии для определения количественного содержания субстанции иммунакора и изучение комплекса валидационных характеристик разработанной методики.

**Материалы и методы.** Для количественного анализа исследуемого вещества использовали методы УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ. Валидация методик была проведена по параметрам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность в соответствии с требованиями ГФ XIV.

**Результаты и обсуждение.** Определены валидационные характеристики и экспериментально подтверждено их соответствие необходимым критериям приемлемости.

**Заключение.** Разработаны методики количественного определения действующего вещества в фармацевтической субстанции 4,4'-диметил-7,7'-этилендиокси-2Н-1-дibenзопиран-2,2'-диона (иммунакора) методом ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии. Установлено, что разработанные методики являются правильными, прецизионными, специфичными и линейными в аналитической области. По воспроизводимости метод ВЭЖХ существенно превосходит метод УФ-спектрофотометрию.

**Ключевые слова:** иммунакор, кумарины, ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрия, количественное определение, валидация.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Нгуен К. Б., Абышев А. З. Валидация методик количественного определения субстанции 4,4'-диметил-7,7'-этилендиокси-2Н-1-дibenзопиран-2,2'-диона. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 59–65.

## VALIDATION METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF 4,4'-DIMETHYL-7,7'-ETHYLENedioxy-2H-1-DIBENZOPYRAN-2,2'-DIONE SUBSTANCE

С. В. Nguyen<sup>1\*</sup>, А. Z. Abyshv<sup>1</sup>

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

\*Corresponding author: Cong B. Nguyen. E-mail: nguyencongbang.ru@gmail.com

Received: 05.10.2018. Accepted: 11.01.2019

### Abstract

**Introduction.** One of the most promising synthetic compounds of coumarin derivatives is immunacor-4,4'-dimethyl-7,7'-ethylenedioxy-2H-1-dibenzopyran-2,2'-dione. As a result of preclinical studies, it has been shown that it is promising in medical practice as an immunomodulator for the treatment and prevention of secondary immunodeficiency diseases.

**Aim.** The objective of this work is to develop methods for HPLC and UV spectrophotometry to determine the quantitative determination of the immunacor substance and to study the complex of validation characteristics of the developed methods.

**Materials and methods.** Quantitative analysis of the substance was carried out by UV-Spectrophotometry and HPLC. Validation procedures were performed on parameters: specificity, linearity, accuracy and precision in accordance with the requirements of GP XIV.

**Results and discussion.** Validation characteristics have been determined, and their compliance with the relevant eligibility criteria has been experimentally verified.

**Conclusion.** Methods for quantitative determination of the active component in 4,4'-dimethyl-7,7'-ethylenedioxy-2H-1-dibenzopyran-2,2'-dione (immunacor) pharmaceutical substance by HPLC and UV spectrophotometry has been developed. It is established that methods are specific, accurate, precise and linear in the analytical field. The precision HPLC method far exceeds the UV-spectrophotometry.

**Keywords:** immunacor, coumarins, HPLC, UV-spectrophotometry, quantitative determination, validation.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Nguyen C. B., Abyshv A. Z. Validation methods for quantitative determination of 4,4'-dimethyl-7,7'-ethylenedioxy-2h-1-dibenzopyran-2,2'-dione substance. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 59–65.

## ВВЕДЕНИЕ

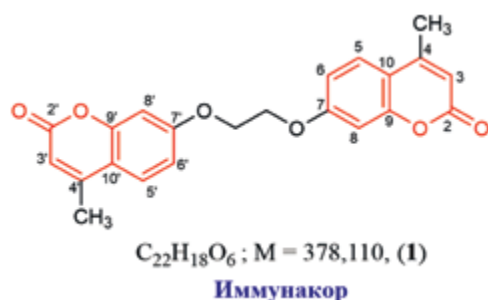
В процессе исследований физико-химических и фармакологических свойств многочисленных природных и синтетических гибридных производных кумарина (2Н-1-бензопиран-2-она) нами было показано, что данная группа веществ обладают достаточно широким спектром фармакологического действия, в том числе антиаритмической, иммуномодулирующей, противо-

вирусной, антигипоксантажной и антикоагулянтной активностями [1–3].

Одной из наиболее перспективных синтетических соединений является иммунакор – 4,4'-диметил-7,7'-этилендиокси-2Н-1-дibenзопиран-2,2'-диона, ранее впервые нами был синтезирован в производственном комплексе «Химия и технология лекарственных препаратов» Санкт-Петербургского НИИ вакцин и сывороток [4]. В результате доклинических исследований на-



ми показано, что перспективность его применения в медицинской практике в качестве иммуномодулятора для лечения и профилактики вторичных иммунодефицитных заболеваний достаточно очевидно [5].



В связи с тем, что данное соединение рекомендуется нами к клиническим испытаниям, необходимо подготовить соответствующих нормативных документов и образцов субстанции. Исходя из актуальности темы, целью настоящей работы являются разработки методик ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии для определения количественного содержания субстанции иммунакора и изучение комплекса валидационных характеристик разработанной методики.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись образцы субстанции иммунакора, его стандартного образца, разработанные нами на кафедре фармацевтической химии ФГБОУ ВО СПХФУ.

### Количественное определение методом ВЭЖХ:

Около 0,025 г (точная навеска) стандартного образца и субстанции помещают в отдельные мерные колбы вместимостью 50 мл, растворяют в 50 мл ДМФА (ОЧС, CAS № 75-05-8, Вектон, Россия) при нагревании, охлаждают и доводят объем раствора до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора переносят в отдельные мерные колбы вместимостью 50 мл, доводят объем раствора ацетонитрилом до метки и перемешивают. Хроматографируют испытуемый раствор и стандартный раствор и определяют площади пиков исследуемого образца.

Определение проводили методом обращенно-фазной ВЭЖХ в режим изократического элюирования, при этом использовали следующее оборудование: высокоэффективный жидкостный хроматограф Agilent 1200 Series («Agilent Technologies», США), снабженный спектрофотометрическим детектором (УФ-детектор модель G1365D). Неподвижная фаза – хроматографическая колонка из нержавеющей стали (длина 25,0 см, диаметр 4,6 мм), заполненная октадецилсиликагелем зернением 5 мкм типа Luna 5u C18(2) (Phenomenex Inc, США). Подвижная фаза – ацетонитрил (HPLC for Gradient Analysis, CAS № 75-05-8, Fisher Scientific, США), содержащий 10% воды и 0,1% муравьиной кислоты – вода, содержащая 10% ацетонитрила и 0,1% муравьиной кислоты (50:50 по объему).

Условия для аналитических определений: скорость потока 1 мл/мин; температура термостата колонки – 27–32 °С; длины волны детектирования – 320 нм; объем пробы – 5 мкл, время анализа – 20 мин.

Содержание иммунакора  $C_{22}H_{18}O_6$  в субстанции в процентах (X) в пересчете на безводное, свободное от остаточных органических растворителей вещество, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot (-W)},$$

где  $S$  – площадь пика иммунакора на хроматограмме стандартного раствора, мАУ.мин;  $S_0$  – площадь пика иммунакора на хроматограмме испытуемого раствора, мАУ.мин;  $a_0$  – навеска стандартного образца иммунакора, г;  $a$  – навеска субстанции, г;  $P$  – содержание  $C_{22}H_{18}O_6$  в стандартном образце, %;  $W$  – суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %

### Количественное определение методом УФ-спектрофотометрии:

Около 0,025 г (точная навеска) стандартного образца и субстанции помещают в отдельные мерные колбы вместимостью 50 мл, растворяют в 50 мл ДМФА при нагревании, охлаждают и доводят объем раствора до метки и перемешивают. 0,4 мл полученного раствора переносят в отдельные мерные колбы вместимостью 25 мл, доводят объем раствора этанолом 96% до метки и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора и стандартного раствора на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ СПЕКТР», Россия) в максимуме поглощения при длине волны  $320 \pm 2$  нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Содержание иммунакора  $C_{22}H_{18}O_6$  в субстанции в процентах (X) в пересчете на безводное, свободное от остаточных органических растворителей вещество, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где  $A$  – оптическая плотность испытуемого раствора;  $A_0$  – оптическая плотность стандартного раствора;  $a_0$  – навеска стандартного образца иммунакора, г;  $a$  – навеска субстанции, г;  $P$  – содержание  $C_{22}H_{18}O_6$  в стандартном образце, %;  $W$  – суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении статистической обработки результатов в соответствии с ОФС «Статистическая обработка результатов эксперимента» (ГФ XIV ОФС.1.1.0013.15) и типовым руководством [6, 7]. Методика была валидирована в соответствии с ОФС «Валидация аналитических методик» (ГФ XIV ОФС.1.1.0012.15) по показателям специфичности, линейности, правильности, прицизионности [6].

**Специфичность** метода УФ-спектрофотометрии была доказана по совпадению максимумов ( $320 \pm 2,0$  нм) и минимумов ( $262 \pm 2,0$  нм) спектров испытуемого раствора и стандартного раствора (рисунок 1), а также отсутствие влияния примеси и растворителя на результаты анализа.

Доказательство специфичности методом ВЭЖХ основано на данных анализа хроматограммы модельных

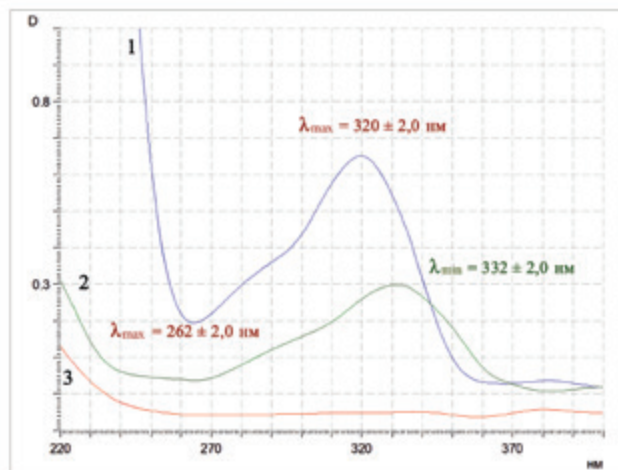


Рисунок 1. УФ-спектры: 1 – СО иммунакор (8,128 мкг/мл); 2 – СО примеси 4-Ме-БЭК (8,128 мкг/мл); 3 – растворители

Figure 1. UV-spectra: 1 – WITH Immunacor (8,128  $\mu\text{g/ml}$ ); 2 – CO impurities 4-Me-BEC (8,128  $\mu\text{g/ml}$ ); 3 – solvents

смесей известного состава (иммунакора и его примеси – 7-(2-бромэтокси)-4-метил-кумарина (4-Ме-БЭК) с концентрацией 25 мкг/мл, индивидуальных веществ и используемого растворителя (рисунки 2–4).

При этом установлено, что время удерживания иммунакора составляет 10,65 мин, 4-Ме-БЭК – 8,87 мин и как видно из рисунков 1–3, на хроматограмме пики определяемых веществ и примеси хорошо разделены между собой, пики примесей из растворителя не мешают определению иммунакора в субстанции.

В соответствии с полученными результатами нами установлено, что специфичность разработанных методик подтверждена.

Пригодность хроматографической системы при спектрофотометрическом определении оценивали путем многократном анализе СО иммунакора. При этом установлено что, относительное стандартное отклонение среднего результата определения (коэффициент вариации) от истинного значения RSD ( $n=6$ ) не превышает 2,0% (0,44%).

Пригодность хроматографической системы при определении действующего вещества в субстанции методом ВЭЖХ оценивали путем последовательного шестикратного хроматографирования стандартного раствора и регистрации хроматограмм (рисунок 4).

Хроматографическая система является пригодной, так как достигается критерия приемлемости пригодности хроматографической системы, предусмотренные проектом НД: относительное стандартное

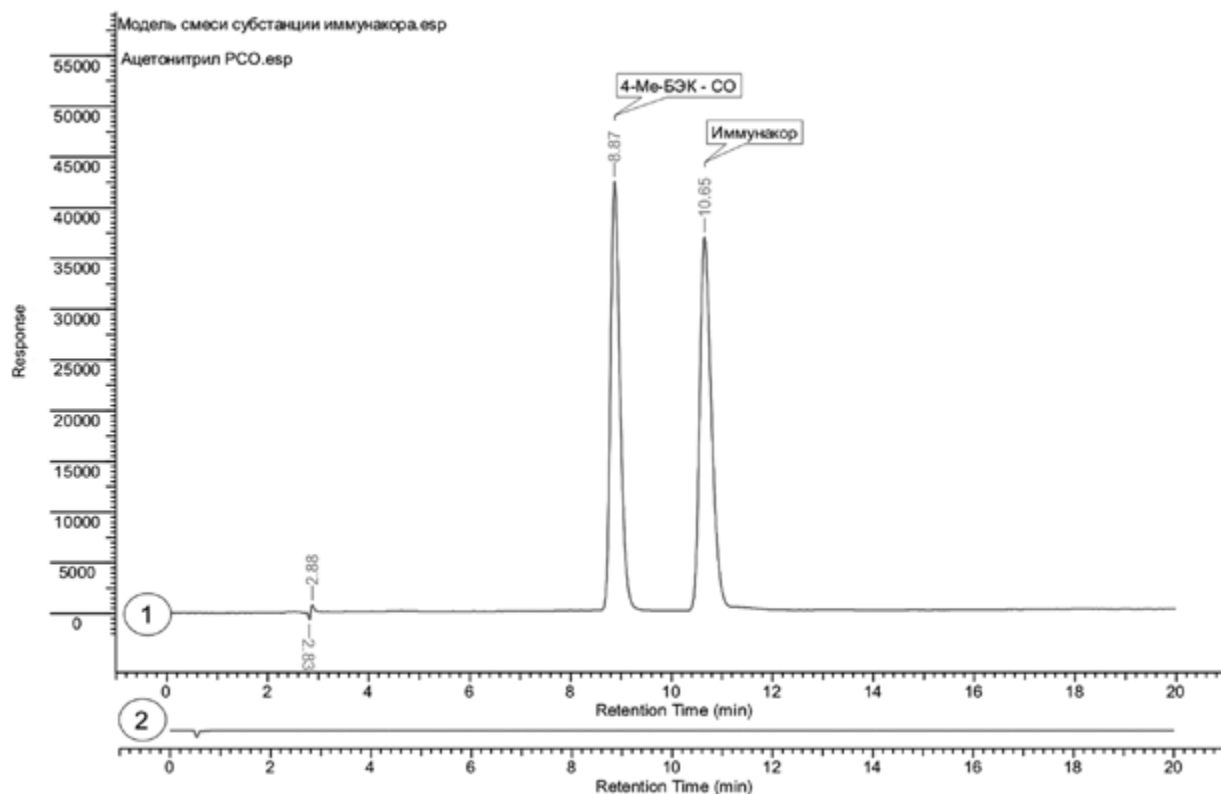


Рисунок 2. ВЭЖХ-хроматограмма модельной смеси (1) и растворителя (2)

Figure 2. HPLC chromatogram of the model mixture (1) and solvent (2)

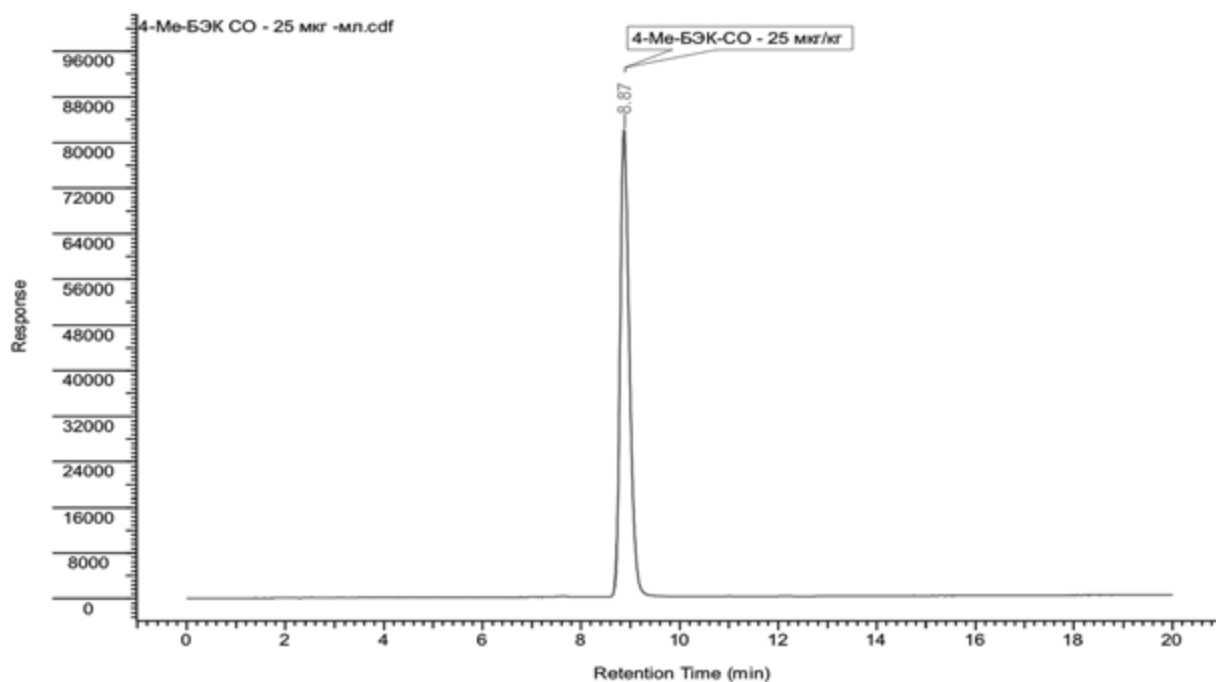


Рисунок 3. ВЭЖХ-хроматограмма СО 4-Ме-БЭК (25 мкг/мл)

Figure 3. HPLC chromatogram of CO 4-Me-BEC (25 µg/ml)

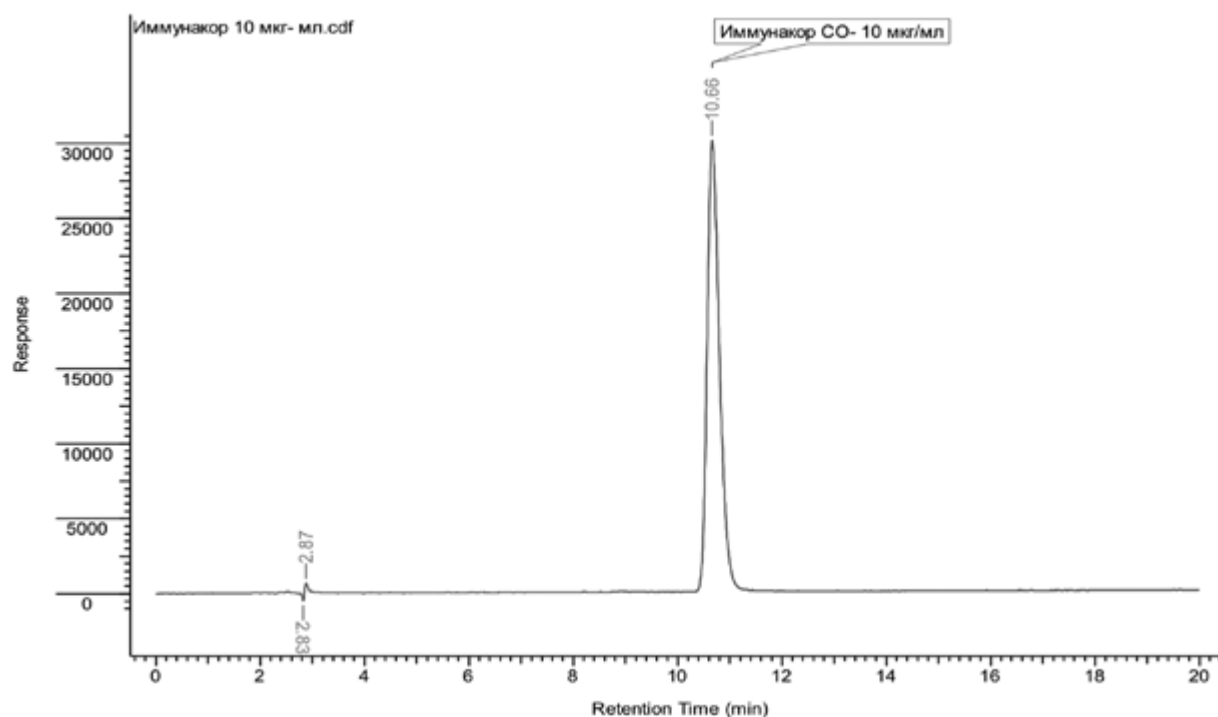


Рисунок 4. ВЭЖХ-хроматограмма СО иммунакора (10 мкг/мл)

Figure 4. HPLC chromatogram of the immunocorus CO (10 µg/ml)

отклонение значений площади пика соединения при многократном анализе раствора – 0,40 (не превышает 2,0 %); фактор удерживания соединения – 2,715 (более 2,0); эффективность колонки (N), определенная по пика соединения – 9897,361 теоретических тарелок (бо-

лее 5000); асимметрия (T) пика соединения – 1,362 (не превышает 1,5) (таблица 1).

**Линейность методики** исследовали на 9 модельных смесей с содержанием исследуемого вещества от 80 до 120% от номинального значения (рисунки 5,



Таблица 1. Рассчитанные параметры пригодности роматографической системы

Table 1. Calculated suitability parameters chromatographic system

| Соединение            | RT, мин      | k            | T            | N               | RSD <sub>1</sub> , % | RSD <sub>2</sub> , % |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------|----------------------|
| Иммунакор             | 10,662±0,005 | 2,715±0,002  | 1,362±0,003  | 9897,361±54,446 | 0,40                 | 0,44                 |
| Критерии приемлемости |              | не менее 2,0 | не более 1,5 | не менее 5000   | не более 2,0 %       | не более 2,0 %       |

Примечание: RSD<sub>1</sub> – метод УФ-спектрофотометрии; RSD<sub>2</sub> – метод ВЭЖХ.

Note: RSD<sub>1</sub> is a UV spectrophotometry method; RSD<sub>2</sub> – HPLC method.

6). Значение коэффициента корреляции составляет 0,9967 (более 0,9950) при  $y_1 = 0,0892x - 0,0544$  для метода УФ-спектрофотометрии; для метода ВЭЖХ составляет 0,9994 (более 0,9950) при  $y_2 = 0,3798x + 0,0244$ , где  $y_1$ ,  $y_2$  – оптическая плотность и площадь пика, соответственно,  $x$  – концентрация (мкг/мл).

Диапазон экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели, в интервале concentra-

ций от 80 до 120% можно рассматривать как *аналитическую область методики*.

**Оценку правильности методики** подтвердили результатами анализа модельных растворов, представленных в таблице 2.

Таблица 2. Результаты определения правильности методик количественного определения иммунакора в субстанции

Table 2. The results of determining the correctness of methods for quantitative determination of immunocor in substance

| Взято, мкг/мл ( $c_1$ )    | Найдено, мкг/мл ( $c_2$ ) | Абсолютная ошибка, мкг/мл ( $d=c_2-c_1$ ) | Относительная ошибка, % ( $Y= dx 100/c_1 $ ) | Найдено, % | Метрологические характеристики ( $P=95\%$ , $n=9$ )                                                                                     |
|----------------------------|---------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Метод УФ-спектрофотометрии |                           |                                           |                                              |            |                                                                                                                                         |
| 6,502                      | 6,467                     | -0,035                                    | -0,54                                        | 99,46      | $\bar{x}=100,38\%$<br>$S=1,55$<br>$S\bar{x}=0,52$<br>$\Delta\bar{x}=1,19$<br>$\Delta x=3,58$<br>$RSD=1,55\%$<br>$\bar{\epsilon}=1,19\%$ |
| 6,909                      | 6,930                     | 0,022                                     | 0,31                                         | 100,31     |                                                                                                                                         |
| 7,315                      | 7,222                     | -0,094                                    | -1,28                                        | 98,72      |                                                                                                                                         |
| 7,722                      | 7,655                     | -0,066                                    | -0,86                                        | 99,14      |                                                                                                                                         |
| 8,128                      | 8,139                     | 0,011                                     | -0,13                                        | 100,13     |                                                                                                                                         |
| 8,534                      | 8,424                     | -0,110                                    | -1,29                                        | 98,71      |                                                                                                                                         |
| 8,941                      | 9,167                     | 0,227                                     | 2,53                                         | 102,53     |                                                                                                                                         |
| 9,347                      | 9,575                     | 0,228                                     | 2,44                                         | 102,44     |                                                                                                                                         |
| 9,754                      | 9,942                     | 0,189                                     | -1,93                                        | 101,93     |                                                                                                                                         |
| Метод ВЭЖХ                 |                           |                                           |                                              |            |                                                                                                                                         |
| 8,128                      | 8,208                     | 0,080                                     | 0,981                                        | 100,98     | $\bar{x}=100,41\%$<br>$S=0,49$<br>$S\bar{x}=0,16$<br>$\Delta\bar{x}=0,37$<br>$\Delta x=1,12$<br>$RSD=0,48\%$<br>$\bar{\epsilon}=0,37\%$ |
| 8,636                      | 8,704                     | 0,068                                     | 0,789                                        | 100,79     |                                                                                                                                         |
| 9,144                      | 9,142                     | -0,002                                    | -0,019                                       | 99,98      |                                                                                                                                         |
| 9,652                      | 9,695                     | 0,043                                     | 0,446                                        | 100,45     |                                                                                                                                         |
| 10,160                     | 10,148                    | -0,012                                    | -0,114                                       | 99,89      |                                                                                                                                         |
| 10,668                     | 10,691                    | 0,023                                     | 0,218                                        | 100,22     |                                                                                                                                         |
| 11,176                     | 11,281                    | 0,105                                     | 0,941                                        | 100,94     |                                                                                                                                         |
| 11,684                     | 11,647                    | -0,037                                    | -0,316                                       | 99,68      |                                                                                                                                         |
| 12,190                     | 12,284                    | 0,092                                     | 0,755                                        | 100,75     |                                                                                                                                         |

При проведении исследования установлено, что в обеих методиках: относительное стандартное отклонение среднего результата определения (коэффициент вариации) от истинного значения RSD ( $n=9$ ) не превышает 2,0%; относительные погрешности среднего результата ( $\bar{\epsilon}$ ) – менее 2,0%, следовательно, правильность разработанных методик подтверждена.

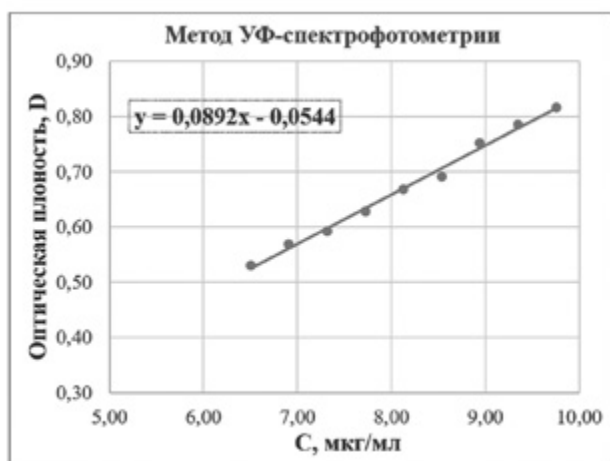


Рисунок 5. График линейной зависимости оптической плотности (D) от концентрации (C) раствора иммунакора

Figure 5. Graph of linear dependence of optical density (D) on concentration (C) of immunocor solution

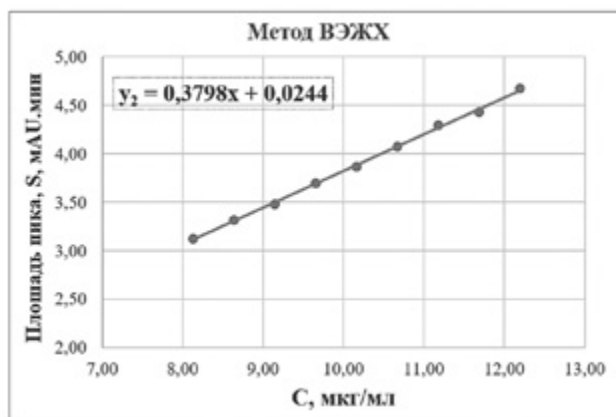


Рисунок 6. График линейной зависимости площади пика (S) от концентрации (C) раствора иммунакора

Figure 6. Graph of the linear dependence of the peak area (S) on the concentration (C) of the immunocor solution

С целью определения **сходимости методик** количественного определения исследуемого вещества в субстанции были приготовлены и проанализированы 3 модельных смесей с содержанием (80%, 100%, 120%) от номинального значения (рисунок 7). Статистический анализ результатов приведен в таблице 3.

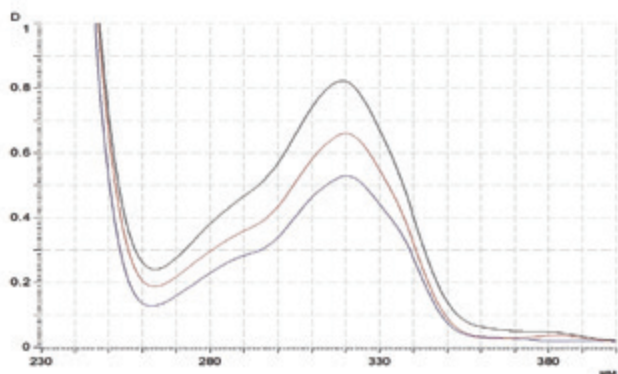


Рисунок 7. УФ-спектры субстанции иммунакора в интервале концентраций от 80 до 120% от номинального значения

Figure 7. UV spectra of the immunocor substance in the concentration range from 80 to 120% of the nominal value

Полученные результаты (таблицы 3, 4), показали, что сходимость количественного определения соединения в субстанции подтверждена, так как: коэффициент вариации не превышает 2%; относительные погрешности среднего результата ( $\bar{\epsilon}$ ) – менее 2,0%; полуширина доверительного интервала среднего результата  $\Delta\bar{x}$  составляет 1,02 и 0,36% для метода УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ, соответственно (не превышает максимально допустимую неопределенность результатов анализа для субстанции  $\Delta_{A_5}=2\%$ ).

Сравнение значений вычисленных критериев Фишера  $F_{\text{выч.}}$  с табличными  $F(P, f_1, f_2)$ , найденными при  $p=95\%$ , показало, что различие значений  $S_1^2$  и  $S_2^2$  значимо, так как описывается неравенством  $F_{\text{выч.}}=7,61 > F_{\text{табл.}}=3,44$ . Следовательно, оба метода дают воспроизводимые результаты, но воспроизводимость метода ВЭЖХ в 3 раза выше, чем в методе УФ-спектрофотометрии.

**Оценка внутрилабораторной прецизионности** при анализе субстанции с полным повторением процедуры приготовления проб в условиях сходимости, выполнялась в разные дни. Внутрилабораторная прецизионность (таблицы 3, 4) определения соединения в субстанции подтверждена на основании результатов анализа: относительные погрешности среднего результата ( $\bar{\epsilon}$ ) не превышает 2%; коэффициент вариации составляет 1,89 и 0,70% для метода УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ, соответственно (не превышает 2%).

Таблица 3. Оценка сходимости и внутрилабораторной прецизионности количественного определения соединения в субстанции методом УФ-спектрофотометрии

Table 3. Estimation of convergence and intralaboratory precision of quantitative determination of a compound in a substance by the method of UV spectrophotometry

| Взято, мг/мл (с <sub>1</sub> )                                       | Найдено, мг/мл (с <sub>2</sub> ) | Абсолютная<br>ошибка, мг/мл<br>(d=c <sub>2</sub> -c <sub>1</sub> ) | Относительная<br>ошибка, %<br>(Y= dx 100/c <sub>1</sub> ) | Найдено, % | Метрологические<br>характеристики<br>(P=95%, n=9)                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| День 1                                                               |                                  |                                                                    |                                                           |            |                                                                                                                                                               |
| 6,502                                                                | 6,596                            | 0,094                                                              | 1,447                                                     | 101,45     | $\bar{x}$ =99,88%<br>S=1,32<br>S $\bar{x}$ =0,44<br>$\Delta\bar{x}$ =1,02<br>$\Delta x$ =3,05<br>RSD=1,33<br>$\bar{\epsilon}$ =1,02%<br>S <sup>2</sup> =1,75  |
|                                                                      | 6,415                            | -0,087                                                             | -1,345                                                    | 98,65      |                                                                                                                                                               |
|                                                                      | 6,431                            | -0,072                                                             | -1,102                                                    | 98,90      |                                                                                                                                                               |
| 8,128                                                                | 8,118                            | -0,010                                                             | -0,120                                                    | 99,88      |                                                                                                                                                               |
|                                                                      | 8,158                            | 0,030                                                              | -0,375                                                    | 100,37     |                                                                                                                                                               |
|                                                                      | 8,023                            | -0,105                                                             | 1,289                                                     | 98,71      |                                                                                                                                                               |
| 9,754                                                                | 9,930                            | 0,176                                                              | 1,809                                                     | 101,81     |                                                                                                                                                               |
|                                                                      | 9,583                            | -0,171                                                             | -1,751                                                    | 98,25      |                                                                                                                                                               |
|                                                                      | 9,845                            | 0,091                                                              | -0,934                                                    | 100,93     |                                                                                                                                                               |
| День 2                                                               |                                  |                                                                    |                                                           |            |                                                                                                                                                               |
| 6,502                                                                | 6,695                            | 0,193                                                              | 2,964                                                     | 102,96     | $\bar{x}$ =100,89%<br>S=1,91<br>S $\bar{x}$ =0,64<br>$\Delta\bar{x}$ =1,47<br>$\Delta x$ =4,41<br>RSD=1,89<br>$\bar{\epsilon}$ =1,46%<br>S <sup>2</sup> =3,65 |
|                                                                      | 6,378                            | -0,124                                                             | -1,908                                                    | 98,09      |                                                                                                                                                               |
|                                                                      | 6,553                            | 0,050                                                              | 0,772                                                     | 100,77     |                                                                                                                                                               |
| 8,128                                                                | 8,277                            | 0,149                                                              | 1,829                                                     | 101,83     |                                                                                                                                                               |
|                                                                      | 8,292                            | 0,164                                                              | -2,024                                                    | 102,02     |                                                                                                                                                               |
|                                                                      | 8,035                            | -0,093                                                             | 1,139                                                     | 98,86      |                                                                                                                                                               |
| 9,754                                                                | 10,015                           | 0,262                                                              | 2,683                                                     | 102,68     |                                                                                                                                                               |
|                                                                      | 9,607                            | -0,146                                                             | -1,502                                                    | 98,50      |                                                                                                                                                               |
|                                                                      | 9,974                            | 0,220                                                              | -2,259                                                    | 102,26     |                                                                                                                                                               |
| Критерий Стьюдента: t <sub>выч.</sub> =1,29<t <sub>табл.</sub> =2,31 |                                  |                                                                    |                                                           |            |                                                                                                                                                               |

Для оценки прецизионности метода количественного определения соединения в субстанции проведена совместная статистическая обработка результатов анализов, полученных при выполнении сходимости и внутрилабораторной прецизионности. Как показало исследование, критерия Стьюдента вычисленного не больше критерия Стьюдента табличного ( $t_{\text{выч.}}=1,29$  (УФ-спектрофотометрия) и 0,58 (ВЭЖХ)  $< t_{\text{табл.}}=2,31$ ). Данные свидетельствуют о том, что разработанная методика обладает приемлемой степенью прецизионности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами были разработаны методики количественного определения субстанции 4,4'-диметил-7,7'-этилендиокси-2Н-1-добензопиран-2,2'-диона (иммунакора) методом ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии.

При помощи валидационной оценки установлено, что разработанные методики количественного определения действующего вещества в субстанции

являются правильными, прецизионными, специфичными и линейными в аналитической области. Однако воспроизводимость метода ВЭЖХ превосходит метод УФ-спектрофотометрии.

**Таблица 4. Оценка сходимости и внутрилабораторной прецизионности количественного определения соединения в субстанции методом ВЭЖХ**

**Table 4. Assessment of convergence and intralaboratory precision quantification of compounds in substance by HPLC**

| Взято, мг/мл ( $c_1$ )                                           | Найдено, мг/мл ( $c_2$ ) | Абсолютная<br>ошибка, мг/мл<br>( $d=c_2 - c_1$ ) | Относительная<br>ошибка, %<br>( $Y= dx100/c_1 $ ) | Найдено, % | Метрологические<br>характеристики<br>( $P=95\%, n=9$ )                                                                                       |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| День 1                                                           |                          |                                                  |                                                   |            |                                                                                                                                              |
| 8,128                                                            | 8,208                    | 0,080                                            | 0,981                                             | 100,98     | $\bar{x}=100,51\%$<br>$S=0,48$<br>$S\bar{x}=0,16$<br>$\Delta\bar{x}=0,37$<br>$\Delta x=1,10$<br>$RSD=0,47$<br>$\bar{e}=0,36\%$<br>$S^2=0,23$ |
|                                                                  | 8,212                    | 0,084                                            | 1,034                                             | 101,03     |                                                                                                                                              |
|                                                                  | 8,196                    | 0,068                                            | 0,840                                             | 100,84     |                                                                                                                                              |
| 10,160                                                           | 10,140                   | -0,020                                           | -0,194                                            | 99,81      |                                                                                                                                              |
|                                                                  | 10,148                   | -0,012                                           | -0,114                                            | 99,89      |                                                                                                                                              |
|                                                                  | 10,167                   | 0,007                                            | 0,065                                             | 100,06     |                                                                                                                                              |
| 12,192                                                           | 12,268                   | 0,076                                            | 0,625                                             | 100,62     |                                                                                                                                              |
|                                                                  | 12,294                   | 0,102                                            | 0,840                                             | 100,84     |                                                                                                                                              |
|                                                                  | 12,255                   | 0,063                                            | 0,517                                             | 100,52     |                                                                                                                                              |
| День 2                                                           |                          |                                                  |                                                   |            |                                                                                                                                              |
| 8,128                                                            | 8,260                    | 0,132                                            | 1,627                                             | 101,63     | $\bar{x}=100,35\%$<br>$S=0,70$<br>$S\bar{x}=0,23$<br>$\Delta\bar{x}=0,54$<br>$\Delta x=1,62$<br>$RSD=0,70$<br>$\bar{e}=0,5\%$<br>$S^2=0,49$  |
|                                                                  | 8,207                    | 0,079                                            | 0,970                                             | 100,97     |                                                                                                                                              |
|                                                                  | 8,191                    | 0,063                                            | 0,776                                             | 100,78     |                                                                                                                                              |
| 10,160                                                           | 10,135                   | -0,025                                           | -0,246                                            | 99,75      |                                                                                                                                              |
|                                                                  | 10,141                   | -0,019                                           | -0,191                                            | 99,81      |                                                                                                                                              |
|                                                                  | 10,156                   | -0,004                                           | -0,039                                            | 99,96      |                                                                                                                                              |
| 12,192                                                           | 12,124                   | -0,068                                           | -0,560                                            | 99,44      |                                                                                                                                              |
|                                                                  | 12,268                   | 0,076                                            | 0,625                                             | 100,62     |                                                                                                                                              |
|                                                                  | 12,2104                  | 0,018                                            | 0,151                                             | 100,15     |                                                                                                                                              |
| Критерий Стьюдента: $t_{\text{выч.}}=0,58<t_{\text{табл.}}=2,31$ |                          |                                                  |                                                   |            |                                                                                                                                              |

## ЛИТЕРАТУРА

- Абышев А. З., Журкович И. К., Ивкин Д. Ю., Нгуен К. Б. Синтез, физико-химический анализ и фармакологическая активность некоторых производных варфарина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 2(19): 192–198.
- Абышев А. З., Нгуен К. Б. Синтетические ковалентно комбинированные производные 2H-1-бензопиран-2-она. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 4(21): 132–138.
- Абышев А. З., Нгуен К. Б., Ивкин Д. Ю., Нгуен Т. Х. Синтез и антиаритмическая активность новых гибридных молекул 1,4-дигидропиридина–кумарина. *Бутлеровские сообщения*. 2018; 1(53): 121–129.
- Патент RU 2242471. Производные 2H-1-бензопиран-2-она, проявляющие антикальциевую активность / А. З. Абышев, Э. М. Агаев; заявитель и патентообладатель Абышев Азад Зияд олгы. – Заявл. 31.07.2003; опубл. 20.12.2004.
- Абышев А. З., Агаев Э. М., Абулла-заде А. А. Природные и синтетические антигены (современное состояние и перспективы

создания новых иммунобиологических диагностических и лечебно-профилактических лекарственных препаратов). – Баку, ООО «Verje». 2007; 334 с.

- Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 1. М.: ФЭМБ. 2018; 1814 с.
- Руководство для предприятий фармацевтической промышленности / методические рекомендации. М., Изд-во: Спорт и Культура – 2000. 2007; 192 с.

## REFERENCES

- Abyshev A. Z., Zhurkovich I. K., Ivkin D. Ju., Nguen K. B. Synthesis, physico-chemical analysis and pharmacological activity of some warfarin derivatives. *Drug development & registration*. 2017; 2(19): 192–198 (In Russ.).
- Abyshev A. Z., Nguen K. B. Synthetic covalently combined 2H-1-benzopyran-2-one derivatives. *Drug development & registration*. 2017; 4(21): 132–138 (In Russ.).
- Abyshev A. Z., Nguen K. B., Ivkin D. Ju., Nguen T. H. Synthesis and antiarrhythmic activity of new hybrid molecules of 1,4-dihydropyridine – coumarin. *Butlerov Communications*. 2018; 1 (53): 121–129.
- Patent RU 2242471. Derivatives of 2H-1-benzopyran-2-one exhibiting anticalcium activity / A. Z. Abyshev, E. M. Agaev; applicant and patent owner Abyshev Azad Ziyad olgy – Appl. July 31, 2003; publ. 12.20.2004 (In Russ.).
- Abyshev A. Z., Agaev Je. M., Abulla-zade A. A. Natural and synthetic antigens (current state and prospects for the creation of new immunobiological diagnostic and therapeutic and prophylactic drugs). – Baku, LLC Verje. 2007; 334 p. (In Russ.).
- State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. V. 1. M.: FEMB. 2018; 1814 p. (In Russ.).
- Guide for enterprises of the pharmaceutical industry / guidelines. M., Publishing house: Sport and Culture – 2000. 2007; 192 p. (In Russ.).



DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-66-71  
УДК 543.89

## ИЗУЧЕНИЕ КИСЛОТНО-ОСНОВНЫХ СВОЙСТВ, РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРИГИНАЛЬНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

Г. М. Алексеева<sup>1</sup>, В. Ф. Апраксин<sup>1</sup>, Ю. Э. Генералова<sup>1\*</sup>

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

\* Контактное лицо: Генералова Юлия Эдуардовна. E-mail: generalova@anchem.pro

Статья получена: 22.11.2018. Статья принята к печати: 25.01.2019

### Резюме

**Введение.** Объектом анализа являлась вновь синтезированная органическая субстанция, производное 4-аминобензойной кислоты и малонового эфира – 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия, обладающий антистезотическим действием. Для количественного определения фармацевтических субстанций предпочтительно использовать титриметрические методы анализа, так как они имеют абсолютный характер и позволяют оценить содержание действующего вещества в субстанции без применения стандартных образцов.

**Цель.** Задачей работы являлось разработка и валидация методики количественного определения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия (ацидиметрия). Методика количественного определения действующего вещества в субстанции 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия в дальнейших исследованиях будет использоваться для рутинного анализа, поэтому выбран визуальный (индикаторный) способ определения конечной точки титрования. Для доказательства пригодности разработанной методики и возможности получения достоверных результатов количественного содержания действующего вещества во вновь синтезированной фармацевтической субстанции с её использованием аналитическая методика была проведена её валидация.

**Результаты и обсуждение.** Изучение кислотно-основных свойств вновь синтезированной субстанции проводили методом потенциометрического титрования, на основании которого рассчитаны значения констант диссоциации. С помощью электронных таблиц по модели титрования многокислотных оснований рассчитаны значения  $pK_{a1}$  и  $pK_{a2}$ , значения которых составляют 7,2 и 5,0. Кривая титрования, построенная по экспериментальным данным, и кривая, построенная по рассчитанным значениям констант диссоциации практически полностью накладываются друг на друга. На основании полученных данных для проведения титрования был выбран индикатор 0,1% водно-спиртовой раствор бромкрезоловый зелёный (синий) с  $pT=4,6$ , интервал перехода окраски которого попадает в скачок титрования определяемого вещества. Проведена валидация разработанной методики согласно требованиям Государственной Фармакопее Российской Федерации XIV издания по показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутилабораторная воспроизводимость), робастность, аналитическая область.

**Заключение.** В результате проведённых исследований определены значения констант кислотной диссоциации вновь синтезированной фармацевтической субстанции 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия, разработана и валидирована методика количественного определения методом кислотно-основного титрования.

**Ключевые слова:** титрование, ацидиметрия, фармацевтическая субстанция, стандартизация, количественное определение, разработка методики, валидация.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Алексеева Г. М., Апраксин В. Ф., Генералова Ю. Э. Изучение кислотно-основных свойств, разработка и валидация методики количественного определения оригинальной фармацевтической субстанции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 66–71.

## EXPLORING OF ACID-BASIC PROPERTIES, DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF ORIGINAL PHARMACEUTICAL SUBSTANCE

G. M. Alekseeva<sup>1</sup>, V. F. Apraksin<sup>1</sup>, Yu. E. Generalova<sup>1\*</sup>

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

\* Corresponding author: Julia E. Generalova. E-mail: generalova@anchem.pro

Received: 22.11.2018. Accepted: 25.01.2019

### Abstract

**Introduction.** The object of analysis was a newly synthesized organic substance, a derivative of 4-aminobenzoic acid and malonic ester – 4,4'-(propandiamido) sodium dibenzoate, which has an antistezotic effect. For the quantitative determination of pharmaceutical substances, it is preferable to use titrimetric methods of analysis, since they are absolute and allow us to estimate the content of the active compound in the substance without using standard samples.

**Aim.** The objective of this work was to develop and validate a quantitative determination method for 4,4'-(propandiamido) sodium dibenzoate.

**Materials and methods.** The analyzed compound is a salt of a weak dibasic acid, which exhibits basic properties in an aqueous solution; therefore, for its quantitative determination, a direct acid-base titration method (acidimetry) was proposed. The method of quantitative determination of the active compound in the substance 4,4'-(propandiamido) sodium dibenzoate will be used in future studies for routine analysis, therefore a visual (indicator) method for determining the end point of the titration has been chosen. To prove the suitability of the developed method and the possibility of obtaining reliable results of the quantitative content of the active compound in the newly synthesized pharmaceutical substance the used analytical method was validated.

**Results and discussion.** The study of the acid-base properties of the newly synthesized substance was carried out using the method of potentiometric titration, on the basis of which the values of the dissociation constants were calculated. Using spreadsheets, the  $pK_{a1}$  and  $pK_{a2}$  values were calculated using a titration model of a multi-basic acid, the  $pK_a$  values of which are 7.2 and 5.0. The titration curve that was constructed from the experimental data and the curve constructed from the calculated values of the dissociation constants almost completely overlapped with each other. Based on the data obtained, a 0.1% water-alcohol solution of bromocresol green (blue) with  $pT=4.6$  was selected for titration, the color transition interval of which falls into the titration jump of the analyte. The developed methodology was validated according to the requirements of the XIV edition State Pharmacopoeia of the Russian Federation by the following indicators: specificity, linearity, accuracy, precision (convergence and internal reproducibility), robustness, analytical domain.

**Conclusion.** As a result of the performed studies, the values of acid dissociation constants of the newly synthesized pharmaceutical substance 4,4'-(propandiamido) sodium dibenzoate were determined, and a method for quantitative determination was developed and validated using acid-base titration.

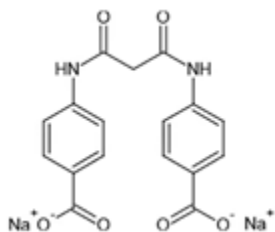
**Keywords:** titration, acidimetry, pharmaceutical substance, standardization, quantification, method development, validation.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Alekseeva G. M., Apraksin V. F., Generalova Yu. E. Exploring of acid-basic properties, development and validation of the method of quantitative determination of original pharmaceutical substance. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 66–71.

## ВВЕДЕНИЕ

Объектом анализа являлась вновь синтезированная органическая субстанция, производное 4-аминобензойной кислоты и малонового эфира – 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия, обладающий антистаеатозным действием.

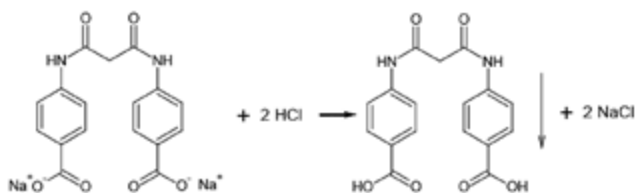


Для количественного определения фармацевтических субстанций (ФС) рекомендовано использовать различные методы анализа (титриметрические, спектральные, хроматографические) [1, с. 102], но большинство из них являются сравнительными методами и требуют использования стандартных образцов (СО), которые недоступны при исследовании вновь синтезированных субстанций. Из перечисленных выше методов анализа только титриметрические имеют абсолютный характер и позволяют оценить содержание действующего вещества в субстанции без применения СО. Титриметрические методы анализа являются наиболее доступными, экспрессными, прецизионными, точными, простыми в аппаратном оформлении.

**Цель работы** – разработка и валидация методики количественного определения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом анализа является оригинальная фармацевтическая субстанция 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия, которая представляет собой белый кристаллический порошок, легко растворимый в воде. Анализируемое соединение является солью слабой двухосновной кислоты, которое в водном растворе проявляет основные свойства, поэтому для его количественного определения предложен метод прямого кислотно-основного титрования (ацидиметрия). Реакция взаимодействия ФС с титрантом протекает по схеме:



Одним из этапов разработки методики количественного определения методом ацидиметрии является выбор способа индикации конечной точки титрования (КТТ). Существует два основных способа

определения КТТ: визуальный и инструментальный. Визуальная индикация КТТ характеризуется экспрессностью анализа, но оценка перехода окраски индикатора в растворе является субъективной. Инструментальная индикация КТТ позволяет более объективно определить точку эквивалентности, но требует больших трудозатрат.

Методика количественного определения действующего вещества в субстанции 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия будет использоваться для рутинного анализа в дальнейших исследованиях, поэтому должна быть максимально простой и экспрессной. Уменьшить время, затрачиваемое на единичный анализ, позволит использование визуального (индикаторного) способа определения КТТ. Для доказательства пригодности разработанной методики и возможности получения достоверных результатов количественного содержания действующего вещества во вновь синтезированной фармацевтической субстанции с её использованием аналитическая методика была проведена её валидация.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение кислотно-основных свойств вновь синтезированной субстанции проводили методом потенциометрического титрования, на основании которого рассчитаны значения констант диссоциации. По результатам титрования с использованием электронных таблиц (Microsoft Office Excel) построена кривая титрования (рисунок 1), которая характеризуется одним хорошо выраженным скачком в диапазоне pH 3,5–5,5, следовательно, константы диссоциации двух карбоксильных групп близки и титруются совместно.

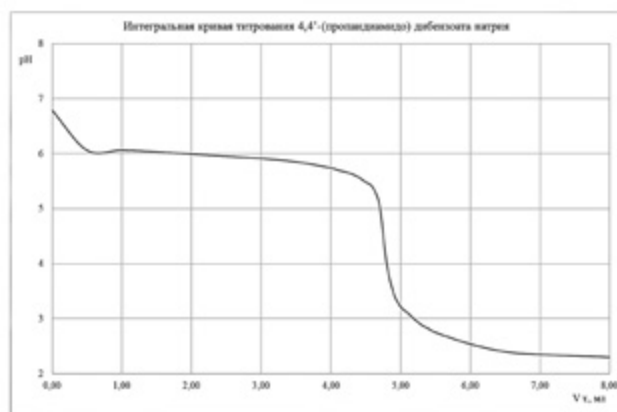


Рисунок 1. Интегральная кривая потенциометрического кислотно-основного титрования 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия

Figure 1. Integral curve of potentiometric acid-base titration of 4,4'-(propanediimido) sodium dibenzoate

Для предварительного расчёта константы диссоциации 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия использована модель титрования одноосновного основания. Потенциометрическое титрование проводили

с использованием рН-метра «Марк-901», в качестве индикаторного использовали стеклянный электрод ЭС-10601/7, в качестве электрода сравнения – хлор-серебряный ЭСР-10101. Измерения проводили при постоянной температуре  $25 \pm 1$  °С и при постоянной ионной силе, которую создавали 0,5 М раствором бромида калия. Готовили раствор анализируемого образца 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия концентрацией 0,05 моль/л (объём раствора 30 мл), титрант – 0,1 М ( $K=1,000$ ) раствор хлороводородной кислоты. Для титрования использовали бюретку объёмом 25 мл, 1 класса точности, погрешность измерения которой составляет  $\pm 0,05$  мл [2, с. 2]. Результаты титрования, рассчитанные значения отрицательного логарифма константы диссоциации 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия в диапазоне фактора оттитрованности 30–80% [3, с. 30], статистическая обработка полученных результатов приведены в таблице 1 (в расчёт вошли 8 измерений из 30).

Таблица 1. Результаты титрования, рассчитанные значения  $pK_a$  4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия и статистическая обработка полученных результатов ( $n=8$ ,  $P=95\%$ )

Table 1. Titration results, calculated  $pK_a$  values of 4,4'-(propandiamido) sodium dibenzoate and statistical processing of the obtained results ( $n=8$ ,  $P=95\%$ )

| № п/п | $V_t$ | pH   | $pK_a$ | Статистическая обработка полученных результатов                                                               |
|-------|-------|------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6     | 5,00  | 6,15 | 5,85   | $\overline{pK_a} = 6,171$<br>$s_x = 0,2174$<br>$s_x = 0,07684$<br>$\Delta pK_a = 0,19$<br>$\delta pK_a = 3\%$ |
| 7     | 6,00  | 6,13 | 5,95   |                                                                                                               |
| 8     | 7,00  | 6,11 | 6,05   |                                                                                                               |
| 9     | 8,00  | 6,08 | 6,13   |                                                                                                               |
| 10    | 9,00  | 6,05 | 6,22   |                                                                                                               |
| 11    | 10,00 | 6,01 | 6,30   |                                                                                                               |
| 12    | 11,00 | 5,96 | 6,39   |                                                                                                               |
| 13    | 12,00 | 5,89 | 6,48   |                                                                                                               |

На основании данных, приведённых в таблице 1, рассчитанное значение отрицательного логарифма константы кислотной диссоциации ( $pK_a$ ) 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия составляет  $6,2 \pm 0,2$ . На основании рассчитанного значения  $pK_a$  и построены кривые титрования, наложение экспериментальной полученной и модельных кривых приведены на рисунке 2.

Для уточнения констант диссоциации, характеризующих две карбоксильные группы исследуемого соединения, с помощью электронных таблиц по модели титрования многокислотных оснований рассчитаны значения  $pK_{a1}$  и  $pK_{a2}$ , значения которых составляют 7,2 и 5,0. На рисунке 3 представлены кривая титрования, построенная по экспериментальным данным, и кривая, построенная с использованием рассчитанных значений констант диссоциации, которые практически

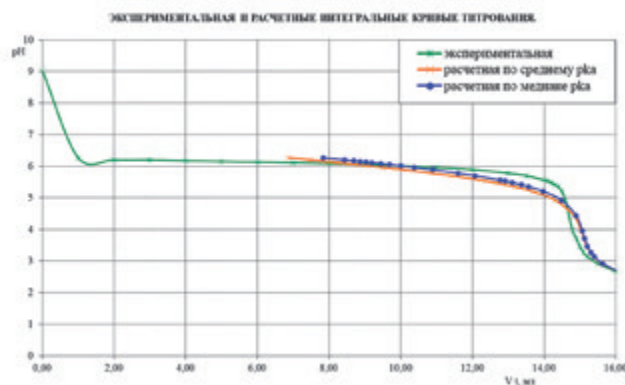


Рисунок 2. Экспериментальная (зелёная линия), рассчитанная по среднему значению константы диссоциации (оранжевая линия) и рассчитанная по медиане кривые титрования 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия

Figure 2. Experimental (green line) calculated by the average value of the dissociation constant (orange line) and median titration curves of 4,4'-(propandiamido) sodium dibenzoate calculated

полностью накладываются друг на друга. На основании полученных данных для проведения титрования был выбран индикатор 0,1% водно-спиртовой раствор бромкрезоловый зелёный (синий) с  $pT=4,6$  [4, с. 1424], интервал перехода окраски которого попадает в скачок титрования определяемого вещества (рисунок 3). Для приготовления раствора индикатора брали навеску 0,1 г индикатора, растворяли в 50 мл 96% спирта, доводили объём раствора водой до 100,0 мл.

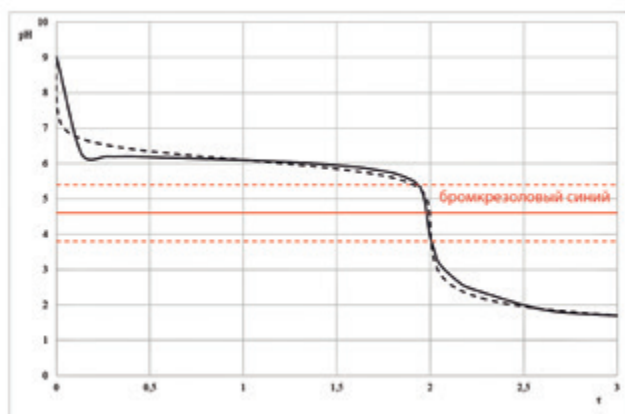


Рисунок 3. Экспериментальная (сплошная линия) и рассчитанная (штриховая линия) кривые титрования 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия

Figure 3. Experimental (solid line) and calculated (dashed line) titration curves of 4,4'-(propandiamido) sodium dibenzoate

Таким образом, на основании экспериментально полученных данных кислотно-основных свойств 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия рекомендована методика количественного определения.

Описание методики: Около 0,15 г (точная навеска) субстанции растворяют в 20 мл воды очищенной, перемешивают до полного растворения субстанции, до-



бавляют 0,1 мл бромкрезолового зелёного (синего). Полученный раствор титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты от синего до жёлтого окрашивания раствора.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1000 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 19,31 мг  $C_{17}H_{12}N_2O_6Na_2$ .

Расчёт количественного содержания действующего вещества в ФС (Р, %) проводят по формуле (1):

$$P = \frac{T \times K \times (V_m^o - V_m^k) \times 100 \times 100}{a \times (100 - W)}, \quad (1)$$

где  $T$  – титр хлористоводородной кислоты по определяемому веществу, мг/мл;  $K$  – поправочный коэффициент концентрации титранта;  $V_m^o$  – объём титранта, пошедший на титрование образца, мл;  $V_m^k$  – объём титранта, пошедший на титрование контрольного опыта, мл;  $a$  – масса навески фармацевтической субстанции, мг;  $W$  – потеря в массе при высушивании, %.

В результате проведенных исследований по разработке методики количественного содержания  $C_{17}H_{12}N_2O_6Na_2$  установлены следующие допустимые значения содержания действующего вещества в фармацевтической субстанции 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия – от 99,0 до 101,0%  $C_{17}H_{12}N_2O_6Na_2$  в пересчете на сухое вещество.

Валидацию методики проводили согласно требованиям Государственной Фармакопее Российской Федерации XIV издания по показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутилабораторная воспроизводимость), робастность, аналитическая область [4, с. 276].

### Специфичность

Специфичность подтверждена отсутствием влияния растворителя на результаты титрования испытуемого раствора (таблица 2).

Таблица 2. Результаты титрования для доказательства специфичности разработанной методики (n=3, P=95%)

Table 2. The results of the titration to prove the specificity of the developed method (n=3, P=95%)

| m, мг                                     | V титранта, мл | P, %   | Стат.обработка                   |
|-------------------------------------------|----------------|--------|----------------------------------|
| Холостой опыт (титрование воды очищенной) |                |        |                                  |
| 0,0                                       | 0,01           | 0,18   | $s_x=0,1137$<br>$P=0,2\pm0,3\%$  |
| 0,0                                       | 0,02           | 0,28   |                                  |
| 0,0                                       | 0,01           | 0,18   |                                  |
| Результаты титрования образца ФС          |                |        |                                  |
| 152,8                                     | 7,72           | 99,57  | $s_x=0,3106$<br>$P=99,9\pm0,7\%$ |
| 157,4                                     | 8,00           | 99,99  |                                  |
| 148,6                                     | 7,54           | 100,17 |                                  |

Как видно из данных таблицы 2, используемый растворитель не искажает результаты количественного определения ФС, следовательно, валидируемая методика специфична.

### Линейность

Исследование линейной зависимости проводили между массой вещества и расходом титранта в диапазоне 80–120% от номинальной концентрации исследуемого образца в растворе. График зависимости представлен на рисунке 4. Результаты статистической обработки полученных данных приведены в таблице 3.

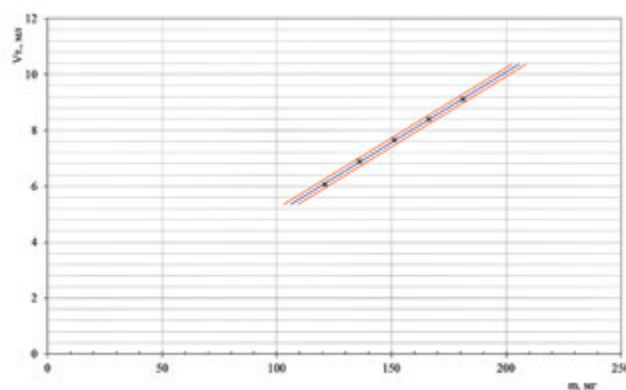


Рисунок 4. График линейной зависимости объёма титранта от массы ФС

Figure 4. Graph of linear dependence of titrant volume on FS mass

Таблица 3. Статистическая обработка результатов, полученных при исследовании линейности валидируемой методики

Table 3. Statistical processing of the results obtained in the study of the linearity of the validated method

| n                | 5       | Доверит. вероятность | 95%    |
|------------------|---------|----------------------|--------|
| Коэф. Стьюдента  | 3,18    | Предел обнаружения   | 43,801 |
| (b) Наклон       | 0,050   | Ст.откл.наклона      | 0,0007 |
| (a) Отрезок      | –0,006  | Ст.откл.отрезка      | 0,1097 |
| (r) Коэф.коррел. | 0,99970 | Дов.инт.наклона      | 0,0023 |
| Ст.откл.прямой   | 0,034   | Дов.инт.отрезка      | 0,3492 |

Таким образом, доказана линейная зависимость в диапазоне концентраций от 80 до 120% анализируемого вещества с высоким значением коэффициента корреляции 0,9997. Пересечение с осью Y составляет 0,08% отклика номинальной концентрации, что удовлетворяет критериям приемлемости.

### Правильность

Для исследования правильности аналитической методики количественного определения ФС использовали данные, полученные при проверке линейности методики (таблица 3). Рассчитанное абсолютное зна-

чение свободного члена уравнения линейной регрессии 0,006 не превышает свой доверительный интервал 0,3492, следовательно, методика свободна от систематической погрешности и даёт правильные результаты.

### Сходимость

Сходимость результатов методики количественного определения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия в ФС устанавливали по результатам титрования 6 проб для испытуемых образцов ФС номинальной концентрации. По результатам анализа рассчитывали величину относительного стандартного отклонения выборки, которое не должно превышать 0,33%. Результаты исследования сходимости валидируемой методики приведены в таблице 4.

**Таблица 4. Результаты исследования сходимости методики количественного определения ФС и статистическая обработка полученных результатов (P=95%, n=6)**

**Table 4. The results of the study of the convergence of the method of quantitative determination of FS and statistical processing of the results obtained (P=95%, n=6)**

| № пробы | а, мг | V, мл | P, %  | Стат. обработка                                  |
|---------|-------|-------|-------|--------------------------------------------------|
| 1       | 157,4 | 7,95  | 99,8  | $\bar{P}=100,1\%$<br>$SD=0,2980$<br>$RSD=0,30\%$ |
| 2       | 148,6 | 7,54  | 100,3 |                                                  |
| 3       | 159,4 | 8,10  | 100,4 |                                                  |
| 4       | 142,9 | 7,26  | 100,4 |                                                  |
| 5       | 145,5 | 7,35  | 99,8  |                                                  |
| 6       | 152,8 | 7,72  | 99,9  |                                                  |

Относительное стандартное отклонение полученных результатов количественного определения вещества в ФС составило 0,30%, что удовлетворяет критерию приемлемости валидируемой методики.

### Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность

Для проверки внутрилабораторной прецизионности результатов количественного определения основного вещества в ФС анализ проводили разные аналитики, в разные дни, на разном оборудовании, используя разные растворы титранта. Для двух полученных выборок рассчитывали F-критерий Фишера и t-критерий Стьюдента, которые не должны превышать табличные значения. Результаты приведены в таблице 5.

Результаты проверки внутрилабораторной прецизионности показали воспроизводимость полученных результатов валидируемой методики, рассчитанные критерии Фишера и Стьюдента не превышают табличные значения, отклонение содержания основного вещества в ФС в обобщённой выборке удовлетворяет критериям приемлемости.

**Таблица 5. Результаты проверки внутрилабораторной прецизионности валидируемой методики, статистическая обработка результатов (P=95%, n=6)**

**Table 5. Results of checking the laboratory precision of the validated method, statistical processing of the results (P=95%, n=6)**

| Аналитик 1 (K=1,020)                                                       |         |                                                  | Аналитик 2 (K=1,000) |         |                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------|---------|--------------------------------------------------|----------------------|---------|--------------------------------------------------|
| а, мг                                                                      | V т, мл | P, %                                             | а, мг                | V т, мл | P, %                                             |
| 157,4                                                                      | 7,95    | 99,8                                             | 158,7                | 8,15    | 99,5                                             |
| 148,6                                                                      | 7,54    | 100,3                                            | 143,7                | 7,45    | 100,5                                            |
| 159,4                                                                      | 8,10    | 100,4                                            | 150,3                | 7,76    | 100,1                                            |
| 142,9                                                                      | 7,26    | 100,4                                            | 157,7                | 8,13    | 99,9                                             |
| 145,5                                                                      | 7,35    | 99,8                                             | 148,7                | 7,67    | 100,0                                            |
| 152,8                                                                      | 7,72    | 99,9                                             | 149,2                | 7,69    | 99,9                                             |
|                                                                            |         | $\bar{P}=100,1\%$<br>$SD=0,2980$<br>$RSD=0,30\%$ |                      |         | $\bar{P}=100,0\%$<br>$SD=0,3065$<br>$RSD=0,31\%$ |
| Критерий Фишера: $F_{\text{расч}} = 1,06 < F_{\text{табл}} = 5,05$         |         |                                                  |                      |         |                                                  |
| Критерий Стьюдента: $t_{\text{расч}} = 0,061 < t_{\text{табл}} = 2,23$     |         |                                                  |                      |         |                                                  |
| $P_{1,2} = 100,0 \pm 0,4\%$<br>$SD_{1,2} = 0,3023$<br>$RSD_{1,2} = 0,30\%$ |         |                                                  |                      |         |                                                  |

### Робастность методики, стабильность растворов

Робастность валидируемой методики оценивали по её способности давать правильные результаты при небольших, контролируемых изменениях в валидируемой методике, а именно: изменении количества индикатора (0,05 мл, 0,1 мл, 0,15 мл или 1, 2, 3 капли соответственно). Стабильность испытуемого раствора изучали через 24, 48, 72 часа хранения после приготовления. При точном воспроизведении описанной методики, полученные результаты количественного определения должны попадать в заданной допустимый диапазон 99–101%.

Результаты исследования робастности валидируемой методики и стабильности анализируемых растворов приведены в таблице 6.

На основании данных, приведённых в таблице 7 можно заключить, что:

- увеличение количества индикатора увеличивает расход титранта, поэтому с целью уменьшения погрешности титрования не рекомендуется добавлять более 0,1 мл (2 капли) индикатора;
- анализируемый раствор устойчив в течение 72 часов при хранении в тёмном, защищённом от света месте при комнатной температуре.

Таким образом, на основании полученных результатов составлено валидационное заключение, представленное в таблице 7.

Таблица 7. Валидационное заключение о пригодности аналитической методики «количественное определение» титриметрическим методом фармацевтической субстанции 4,4' – (пропандиамидо)дibenзоат натрия, субстанция

Table 7. Validation conclusion on the suitability of the analytical method «quantitative determination» by the titrimetric method of the pharmaceutical substance 4,4' – (propandiamido) sodium dibenzoate, substance

| №п/п | Валидационная характеристика                      | Критерий приемлемости                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Результат испытаний                                                                                          | Соответствует/ не соответствует                 |
|------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 1    | Специфичность                                     | ● растворитель, используемый для подготовки пробы, не искажает результат содержания ФС                                                                                                                                                                                                                      | Растворитель не искажают результаты определения                                                              | Соответствует                                   |
| 2    | Линейность                                        | ● коэффициент корреляции $\geq 0,990$ ;<br>● для количественного определения основного вещества пересечение с осью Y – не более 2% отклика номинальной концентрации                                                                                                                                         | 0,9997<br>0,08%                                                                                              | Соответствует<br>Соответствует                  |
| 3    | Сходимость                                        | ● RSD должно быть не более значения, определённого в соответствии с таблицей 6.1 для кислотно-основного титрования – 0,33%                                                                                                                                                                                  | RSD=0,30%                                                                                                    | Соответствует                                   |
| 4    | Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность | ● RSD результатов второго аналитика должно быть не более 0,33%;<br>● рассчитанное значения критерий Фишера должно быть не больше табличного значения;<br>● рассчитанное значение критерия Стюдента должно быть менее табличного значения                                                                    | RSD=0,31%<br>$F_{\text{расч}}=1,06 < F_{\text{табл}}=5,05$<br>$t_{\text{расч}}=0,061 < t_{\text{табл}}=2,23$ | Соответствует<br>Соответствует<br>Соответствует |
| 5    | Правильность                                      | ● абсолютное значение свободного члена в уравнении линейной регрессии должно быть меньше его доверительного интервала                                                                                                                                                                                       | 0,006 < 0,3492                                                                                               | Соответствует                                   |
| 6    | Робастность                                       | ● результаты содержания действующего вещества, полученные по методике при изменении количества добавляемого индикатора, должны составлять 99–101%;<br>● результаты содержания действующего вещества, полученные по методике при хранении испытуемого раствора в течение 72 часов, должны составлять 99–101% | Рекомендуется добавление не более 0,1 мл (2 капли) индикатора бромкрезолового зелёного (синего)<br><br>99,6% | Соответствует<br><br>Соответствует              |

**Примечание:** все параметры, указанные в протоколе валидации, удовлетворяют критериям приемлемости. Результаты валидационных испытаний подтверждают пригодность аналитической методики «Количественное определение» 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия, субстанция.

Таблица 6. Результаты исследования устойчивости методики количественного определения ФС

Table 6. The results of the study of the stability of the method of quantitative determination of FS

| Условия титрования                | V, мл | P, %  | Допустимый диапазон P |
|-----------------------------------|-------|-------|-----------------------|
| Количество индикатора             |       |       |                       |
| 0,05 мл (1 капля)                 | 7,70  | 99,4  | 99–101%               |
| 0,1 мл (2 капли)                  | 7,73  | 99,8  |                       |
| 0,15 мл (3 капли)                 | 7,79  | 100,5 |                       |
| Стабильность испытуемого раствора |       |       |                       |
| 0 часов                           | 7,73  | 99,8  | 99–101%               |
| 24 часа                           | 7,71  | 99,5  |                       |
| 48 часов                          | 7,69  | 99,2  |                       |
| 72 часа                           | 7,73  | 99,8  |                       |

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых исследований определены значения констант кислотной диссоциации вновь синтезированной фармацевтической субстанции

4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия, разработана и валидирована методика количественного определения методом кислотно-основного титрования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: *Гриф и К*. 2013; 280 с.
2. Межгосударственный стандарт ГОСТ 29251-91. Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 1. Общие требования.
3. Альберт А., Сергент Е. Константы ионизации кислот и оснований. М.-Л.: *Химия*. 1964; 180 с.
4. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 1. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

## REFERENCES

1. Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. V. II. M.: *Grief and K*. 2013; 280 p.
2. Interstate standard GOST 29251-91. Laboratory glassware. Burettes. Part 1. General requirements.
3. Albert A., Sergeant E. Ionization constants of acids and bases. M.-L.: *Chemistry*. 1964; 180 p.
4. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. V. 1. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.





# РосФарма

НА ПУТИ К ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМУ  
ЛИДЕРСТВУ

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-73-77  
УДК 574.24:615.322

# КОНТРОЛЬ РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ И КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ НА ПРИМЕРЕ КОРНЕЙ ЛОПУХА ОБЫКНОВЕННОГО

Н. А. Дьякова<sup>1\*</sup>, А. И. Сливкин<sup>1</sup>, С. П. Гапонов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ВГУ), 394018, Россия, Воронеж, Университетская площадь, 1

\*Контактное лицо: Дьякова Нина. E-mail: office@main.vsu.ru

Статья получена: 15.11.2018. Статья принята к печати: 00.01.2019

## Резюме

**Введение.** Радионуклиды в настоящее время признаны одними из самых опасных загрязнителей окружающей среды в силу их активной миграции по биологическим цепям и влияния на метаболизм живых организмов.

**Цель.** Изучение накопления радионуклидов и полисахаридов в корнях лопуха большого, собранного на территории Воронежской области в районах, испытывающих на себе различное антропогенное воздействие, а также исследование взаимосвязи между накоплением данных групп веществ.

**Материалы и методы.** На территории Воронежской области на основе картографического обзора были выбраны 36 точек отбора образцов лекарственного растительного сырья. Объектом исследования стали корни лопуха обыкновенного, как многолетнего повсеместно произрастающего сырья. В отобранных образцах определяли основные искусственные (стронций-90, цезий-137) и часто встречаемые в природе естественные радионуклиды (калий-40, торий-232, радий-226), а также концентрацию суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу и суммы гравиметрически определяемых полисахаридов.

**Результаты и обсуждение.** Все образцы удовлетворяют требованиям фармакопейной статьи по содержанию искусственных радионуклидов. Содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу, определяемых спектрофотометрическим методом, в изучаемых образцах корней лопуха обыкновенного сильно варьировало в зависимости от места сбора сырья. Так, в заповедных районах содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу в среднем на 30–45% превышало содержание данных биологически активных веществ в образцах в образцах из экологически неблагополучных районов. При этом все отобранные образцы корней лопуха обыкновенного также соответствуют требованиям фармакопеи по содержанию суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу. Содержание полисахаридов, близкое к нижнему значению нормы, наблюдалось у образца, собранного в Поворино, для остальных образцов содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу значительно превышает установленный нормативной документацией числовой показатель. Содержание водорастворимых полисахаридов, определяемых методом гравиметрии, в корнях лопуха обыкновенного варьирует в диапазоне от 21,17 до 37,82%. Заметного влияния на накопление этой группы соединений антропогенное влияние не оказывает: образцы, собранные в экологически неблагоприятных зонах, мало отличаются по количественному содержанию водорастворимых полисахаридов от образцов из заповедных зон.

**Заключение.** Вычисленные значения коэффициентов корреляции между содержанием радионуклидов и основных групп биологически активных веществ в корнях лопуха обыкновенного показали, что накапливаемые корнями лопуха обыкновенного радионуклиды, вероятно, в силу своего незначительного содержания, не оказывают влияния на содержание в лекарственном растительном сырье биологически активных веществ.

**Ключевые слова:** Воронежская область, лопух обыкновенный, радионуклиды, стронций-90, цезий-137, торий-232, калий-40, радий-226, полисахариды.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П. Контроль радиационной безопасности и качества лекарственного растительного сырья воронежской области на примере корней лопуха обыкновенного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 73–77.

## CONTROL OF RADIOACTIVE SAFETY AND QUALITY OF MEDICINAL VEGETABLE RAW MATERIALS OF THE GREATER BURDOCK (*ARCTIUM LAPPA* L.) ROOTS IN VORONEZH REGION

N. A. Dyakova<sup>1\*</sup>, A. I. Slivkin<sup>1</sup>, S. P. Gaponov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394006, Russia

\*Corresponding author: Nina A. Dyakova. E-mail: office@main.vsu.ru

Received: 15.11.2018. Accepted: 00.01.2019

## Abstract

**Introduction.** Radionuclides are recognized as one of the most dangerous pollutants of a surrounding medium in forces of their fissile migration on biological chains and influences on metabolism of alive organisms now.

**Aim.** Studying of accumulation of radionuclides and polysaccharides in roots of a burdock big, collected in the territory of the Voronezh region in the areas which are influenced various anthropogenic influence and also an interrelation research between accumulation of these groups of substances.

**Materials and methods.** The raw material was collected in the territory of Voronezh Region in the areas with different anthropogenic impact. Based on cartography the 36 points of the medicinal vegetable raw material samples collection were chosen in Voronezh Region. The subject matter was the roots of the Greater Burdocks as a wide spread perennial plant. The main artificial (Sr-90 and Cs-137) and natural (K-40, Th-232 and Ra-226) radionuclides as well as a concentration of the total amount of polysaccharides in terms of fructose and the total amount of gravimetrically determined polysaccharides were defined in the samples.

**Results and discussion.** All the samples met the requirements of the pharmacopoeial article of the artificial radionuclides content. A content of the total amount of polysaccharides in terms of fructose determined by spectrophotometry significantly varied in the root samples depends on their collection point. Thus, in protected reserved areas a content of the total amount of polysaccharides in term of fructose was 30–45 % high than in the samples from ecologically unfavourable areas. However all the samples also met the requirements of the pharmacopoeial article of the total amount of polysaccharides in terms of fructose. A content of the polysaccharides close to the lower norm was found out in a sample collected in Povorino, while a content of the polysaccharides in terms of fructose significantly exceeded the normative standard in the rest of the samples. A content of gravimetrically determined water-soluble polysaccharides in the roots varied from 21,17 to 37,82 %. No noticeable anthropogenic effect on the accumulation of these substances was found. The samples from ecologically unfavourable and protected areas were little different from each other in a quantitative content of water-soluble polysaccharides.

**Conclusion.** The correlation coefficients between the content of radionuclides and major groups of bioactive substances in the roots indicated that the radionuclides accumulated in the greater burdock roots in a minor amounts and they did not affect the content of bioactive substances in plant raw material.

**Keywords:** Voronezh Region, Greater Burdock, radionuclide, Sr-90, Cs-137, Th-232, K-40, Ra-226, polysaccharides.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Dyakova N. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P. Control of radioactive safety and quality of medicinal vegetable raw materials of the greater burdock (*Arctium lappa* L.) roots in voronezh region. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 73–77.

## ВВЕДЕНИЕ

Центральное Черноземье традиционно является важнейшим районом растениеводства и заготовки лекарственного растительного сырья. Освоение минеральных ресурсов, активная химизация в сельском хозяйстве, последствия Чернобыльской аварии актуализировали вопрос снабжения фармацевтической и пищевой промышленности безопасным и эффективным растительным сырьем. Некачественное растительное сырье и получаемые из него продукты являются важными источниками поступления различных экотоксикантов, в частности радионуклидов, в организм человека [1–4]. Обостряет данную проблему и тот факт, что радионуклиды активно накапливаются в живых организмах и способны к миграции по трофическим цепям [5, 6]. Кроме того, данные поллютанты оказывают значительное влияние на метаболизм самого растительного организма, снижая продукцию биологически активных веществ [7, 8].

Целью данного исследования являлось изучение накопления естественных и искусственных радионуклидов, а также биологически активных веществ в корнях лопуха большого, собранного на территории Воронежской области в районах, испытывающих на себе различное антропогенное воздействие, а также исследование взаимосвязи между накоплением данных групп веществ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор сырья проводился по всей территории области (рисунок 1, таблица 1). Объектом исследования были выбраны корни лопуха обыкновенного (*Arctium lappa* L.). Лопух обыкновенный является крупным многолетним синантропным растением, произрастающим

в Воронежской области повсеместно. Основная группа биологически активных веществ в корнях лопуха обыкновенного – полисахариды, которые обладают сахароснижающим, иммуностимулирующим, пребиотическим, сорбирующим, диуретическим, противоопухолевым действием [9].

Таблица 1. Средние значения содержания радионуклидов и ВРПС в изучаемых образцах

Table 1. Average values of radionuclides and VRPS in the studied samples

| № п/п | Район сбора                                               | Активность радионуклидов, Бк/кг |           |           |          |           | Содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу, % | Содержание ВРПС, % |
|-------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------------------------------------------------------|--------------------|
|       |                                                           | Стронций-90                     | Цезий-137 | Торий-232 | Калий-40 | Радий-226 |                                                           |                    |
| 1     | Воронежский биосферный заповедник                         | 10,4                            | 57,1      | 12,1      | 308      | 9,4       | 15,75                                                     | 37,82              |
| 2     | Хоперский заповедник                                      | 11,2                            | 28,1      | 11,3      | 461      | 9,6       | 14,72                                                     | 34,58              |
| 3     | Борисоглебский район                                      | 11,6                            | 27,3      | 14,6      | 418      | 7,2       | 15,29                                                     | 38,94              |
| 4     | с. Елань-Колено                                           | 10,8                            | 29,4      | 18,4      | 451      | 11,4      | 13,53                                                     | 31,85              |
| 5     | Нижнедевицкий район                                       | 16,7                            | 57,3      | 14,3      | 428      | 18,0      | 13,59                                                     | 28,60              |
| 6     | Острогожский район                                        | 13,9                            | 53,2      | 20,1      | 590      | 19,4      | 11,54                                                     | 34,64              |
| 7     | Семилукский район                                         | 15,2                            | 59,8      | 19,4      | 510      | 20,1      | 12,84                                                     | 24,19              |
| 8     | г. Нововоронеж                                            | 9,0                             | 60,1      | 20,3      | 483      | 18,7      | 12,08                                                     | 27,54              |
| 9     | Воронеж-Нововоронеж (высоковольтные линии электропередач) | 12,9                            | 58,6      | 17,4      | 498      | 20,3      | 10,24                                                     | 21,17              |
| 10    | Лискинский район                                          | 8,2                             | 51,0      | 12,1      | 356      | 15,6      | 12,29                                                     | 25,82              |
| 11    | Ольховатский район                                        | 13,1                            | 42,9      | 24,3      | 474      | 18,9      | 11,03                                                     | 32,75              |
| 12    | Подгоренский район                                        | 14,6                            | 43,7      | 22,1      | 614      | 20,0      | 10,25                                                     | 35,18              |
| 13    | Петропавловский район                                     | 10,0                            | 29,6      | 19,6      | 553      | 16,1      | 14,56                                                     | 30,63              |
| 14    | Грибановский район                                        | 11,2                            | 27,8      | 16,4      | 493      | 19,8      | 10,67                                                     | 22,53              |
| 15    | Хохольский район                                          | 15,7                            | 57,3      | 23,1      | 550      | 19,6      | 11,80                                                     | 31,85              |
| 16    | Новохоперский район                                       | 13,1                            | 29,2      | 18,3      | 510      | 20,4      | 12,89                                                     | 26,80              |
| 17    | Репьевский район                                          | 15,2                            | 57,3      | 14,8      | 497      | 15,9      | 10,57                                                     | 23,74              |



Рисунок 1. Карта отбора образцов корней лопуха большого (обозначения расшифрованы в таблице 1)

Figure 1. Sampling map of burdock root (denoted in Table 1)



| № п/п                           | Район сбора                                                            | Активность радионуклидов, Бк/кг |           |           |          |           | Содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу, % | Содержание ВРПС, % |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------------------------------------------------------|--------------------|
|                                 |                                                                        | Стронций-90                     | Цезий-137 | Торий-232 | Калий-40 | Радий-226 |                                                           |                    |
| 18                              | Воробьевский район                                                     | 11,0                            | 27,1      | 19,3      | 450      | 17,3      | 14,05                                                     | 35,44              |
| 19                              | Панинский район                                                        | 13,9                            | 46,8      | 16,4      | 518      | 18,6      | 13,67                                                     | 36,73              |
| 20                              | Верхнехавский район                                                    | 15,7                            | 54,3      | 21,1      | 511      | 18,9      | 9,46                                                      | 25,85              |
| 21                              | Эртильский район                                                       | 16,3                            | 37,1      | 21,4      | 484      | 19,4      | 13,27                                                     | 22,05              |
| 22                              | Россошанский район                                                     | 13,1                            | 46,2      | 19,1      | 563      | 17,2      | 10,31                                                     | 25,10              |
| 23                              | Вблизи ОАО «Минудоб-рения»                                             | 13,9                            | 41,7      | 21,6      | 541      | 17,0      | 9,57                                                      | 24,08              |
| 24                              | п.г.т. Поворино                                                        | 10,1                            | 28,3      | 15,3      | 434      | 19,4      | 8,46                                                      | 25,98              |
| 25                              | г. Борисоглебск                                                        | 9,6                             | 29,9      | 16,1      | 453      | 15,4      | 13,93                                                     | 30,17              |
| 26                              | г. Калач                                                               | 12,1                            | 30,7      | 18,8      | 571      | 17,6      | 14,42                                                     | 34,26              |
| 27                              | Вблизи тепло-электроцентра-ли «ВОГРЭС»                                 | 12,8                            | 75,8      | 32,3      | 918      | 21,8      | 12,74                                                     | 23,85              |
| 28                              | Вблизи пред-приятия по производству синтетического каучука ООО «Сибур» | 14,3                            | 70,1      | 29,4      | 943      | 20,6      | 10,64                                                     | 23,13              |
| 29                              | Вдоль водохранилища                                                    | 13,6                            | 73,2      | 22,2      | 913      | 20,1      | 14,64                                                     | 32,61              |
| 30                              | Вблизи аэропорта                                                       | 10,8                            | 46,7      | 20,4      | 411      | 15,9      | 9,35                                                      | 27,53              |
| 31                              | Улица города                                                           | 15,6                            | 68,8      | 27,4      | 891      | 20,5      | 11,16                                                     | 26,42              |
| 32                              | Вдоль трассы М4 (Рамонский район)                                      | 13,3                            | 54,7      | 15,6      | 421      | 14,7      | 12,04                                                     | 25,64              |
| 33                              | Вдоль трассы А144 (Анна)                                               | 10,9                            | 58,3      | 16,9      | 461      | 9,8       | 10,86                                                     | 26,19              |
| 34                              | Вдоль трассы М4 (Павловск)                                             | 10,2                            | 49,6      | 14,0      | 411      | 14,5      | 12,75                                                     | 33,92              |
| 35                              | Вдоль нескоростной автомобильной дороги                                | 10,3                            | 26,1      | 19,3      | 472      | 18,6      | 14,04                                                     | 29,40              |
| 36                              | Вдоль железной дороги                                                  | 13,8                            | 36,6      | 17,2      | 389      | 15,7      | 10,21                                                     | 33,06              |
| Среднее для Воронежской области |                                                                        | 12,6                            | 46,4      | 19,0      | 526      | 17,0      | 12,20                                                     | 29,17              |
| ПДК [10,11]                     |                                                                        | 200                             | 400       | –         | –        | –         | Не менее 8                                                | –                  |

Определяли основные искусственные (стронций-90, цезий-137) и часто встречаемые в природе естественные радионуклиды (калий-40, торий-232, радий-226) на спектрометре-радиометре МКГБ-01 «РАДЭК» (ООО «НТЦ «РАДЭК», Россия) [10]. Взвешивание осуществляли на аналитических весах «A&D GH-202» (AND, Япония). Содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу определяли по методике ФС.2.5.0025.15 с применением спектрофотометра «HitachiU-1900» (Hitachi, Япония) [11]. Также для сравнения изучали содержание гравиметрически определяемых водорастворимых полисахаридов (ВРПС) по экспрессной методике с применением ультразвуковой ванны Град 40-35 (Град-Технолоджи, Россия) [12, 13]. Каждое определение проводили трижды. Данные, полученные в ходе исследований, статистически обрабатывали с помощью пакета программ «Microsoft Excel» с использованием t-критерия Стьюдента при доверительной вероятности 0,95.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований корней лопуха обыкновенного на содержание радионуклидов и полисахаридов приведены в таблице 1.

Результаты исследования отобранного сырья показали, что все образцы удовлетворяют требованиям фармакопейной статьи по содержанию искусственных радионуклидов [10]. Содержание естественных радионуклидов в лекарственном растительном сырье в настоящее время не нормируется.

Содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу в изучаемых образцах корней лопуха обыкновенного сильно варьировало в зависимости от места сбора сырья. Так, в экологически чистых заповедных районах содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу в среднем на 30–45% превышало содержание данных биологически активных веществ в образцах из экологически неблагополучных районов (вблизи автомобильных и железных дорог, вблизи промышленных предприятий и крупных городов). При этом все отобранные образцы корней лопуха обыкновенного также соответствуют требованиям фармакопеи [11] по содержанию суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу. К нижнему значению нормы приблизился лишь один образец, собранный в п.г.т. Поворино, для остальных образцов содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу значительно превышает установленный нормативной документацией числовой показатель.

Содержание ВРПС в корнях лопуха обыкновенного варьирует в диапазоне от 21,17 до 37,82%. Таким образом, заметного влияния на накопление этой группы соединений антропогенное влияние не оказывает: образцы, собранные в экологически неблагоприятных

зонах, мало отличаются по количественному содержанию ВРПС от образцов из заповедных зон.

Для детального анализа влияния содержания в растениях радионуклидов на накопление полисахаридов были рассчитаны коэффициенты корреляции (таблица 2) [7, 14].

**Таблица 2. Коэффициенты корреляции между содержанием радионуклидов и полисахаридов в корнях лопуха обыкновенного**

**Table 2. Correlation coefficients between the content of radionuclides and polysaccharides in burdock roots**

| Определяемая группа БАВ                     | Коэффициенты корреляции |           |           |          |           |
|---------------------------------------------|-------------------------|-----------|-----------|----------|-----------|
|                                             | Стронций-90             | Цезий-137 | Торий-232 | Калий-40 | Радий-226 |
| Сумма полисахаридов в пересчете на фруктозу | -0,24                   | -0,20     | -0,26     | -0,07    | -0,38     |
| Водорастворимые полисахариды                | -0,21                   | -0,30     | -0,28     | -0,22    | -0,45     |

Полученные значения коэффициентов корреляции между содержанием радионуклидов и основных групп биологически активных веществ в корнях лопуха обыкновенного показали, что накапливаемые корнями лопуха обыкновенного радионуклиды, вероятно, в силу своего незначительного содержания, не оказывают значительного влияния на содержание в них биологически активных веществ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования отобранных корней лопуха показали, что все образцы соответствуют требованиям государственной фармакопеи. Коэффициенты корреляции между содержанием радионуклидов и полисахаридов в корнях лопуха обыкновенного показали, что накапливаемые корнями лопуха обыкновенного радионуклиды, вероятно, в силу своего незначительного содержания, не оказывают заметного влияния на содержание в них биологически активных веществ. Дальнейшие исследования нами решено было направить на выявление воздействия искусственных и природных радионуклидов на накопление в разных видах лекарственного растительного сырья флавоноидов, кумаринов и эфирных масел.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Великанова Н. А. Экологическая оценка состояния лекарственного растительного сырья (на примере *Polygonum aviculare* L. и *Plantago major* L.) в урбоусловиях города Воронежа и его окрестностей: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Воронеж, Изд-во: ВГУ. 2013: 21 с.
2. Гапонов С. П., Дьякова Н. А., Сливкин А. И. Изучение особенностей накопления радионуклидов травой полыни горькой. Пути и формы совершенствования фармацевтического образования.

Создание новых физиологически активных веществ: Сб. науч. тр. Воронеж. 2016; 232–236.

3. Гапонов С. П., Дьякова Н. А., Сливкин А. И. Особенности накопления искусственных и природных радионуклидов травой тысячелистника обыкновенного. Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: Сб. науч. тр. Воронеж, ИПЦ ВГУ. 2016: 236–239.
4. Терешкина О. И., Рудакова И. П., Самылина И. А. Оценка риска радионуклидного загрязнения лекарственного растительного сырья. Фармация. 2011; 7: 3–6.
5. Сливкин А. И., Гапонов С. П., Великанова Н. А. Изучение особенностей накопления радионуклидов из почв лекарственными растениями *Polygonum aviculare* и *Plantago major*, произрастающими в городе Воронеже и его окрестностях. Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: Сб. науч. тр. Воронеж. 2013; 510–513.
6. Сливкин А. И., Гапонов С. П., Великанова Н. А. Изучение радиационной безопасности лекарственного растительного сырья в городе Воронеже и его окрестностях на примере травы горца птичьего и листьев подорожника большого. Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: Сб. науч. тр. Воронеж. 2013; 513–515.
7. Дьякова Н. А. Эффективность и радиационная безопасность лекарственного растительного сырья подорожника большого, собранного в Центральном Черноземье. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018; 3 (24): 144–147.
8. Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П. Изучение радионуклидного загрязнения лекарственного сырья Воронежской области на примере листьев подорожника большого и листьев крапивы двудомной. Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2017; 2: 118–123.
9. Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П., Самылина И. А. Оценка радионуклидного загрязнения лекарственного растительного сырья Воронежской области на примере корней лопуха обыкновенного. Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2016; 3: 110–115.
10. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. / МЗ РФ. М., 2015; 1470 с.
11. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2. / МЗ РФ. М., 2015; 1003 с.
12. Дьякова Н. А., Самылина И. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П., Мындра А. А. Разработка и валидация экспрессной методики количественного определения водорастворимых полисахаридов в корнях лопуха обыкновенного (*Arctium lappa* L.). Химико-фармацевтический журнал. 2015; 49(9): 35–38.
13. Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П., Михайловская И. Ю. Изучение динамики изменения содержания инулина в корнях лопуха большого (*Arctium lappa* L.) и одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Webb.) в процессе вегетации. Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2016; 4: 133–136.
14. Великанова Н. А., Гапонов С. П., Сливкин А. И. Экооценка лекарственного растительного сырья в урбоусловиях г. Воронежа. LAMBERT Academic Publishing. 2013; 211 с.

## REFERENCES

1. Velikanova N.A. Ecological assessment of the state of medicinal plant materials (using the example of *Polygonum aviculare* L. and *Plantago major* L.) in the urban environment of Voronezh and its surroundings: author. dis. ... Cand. biol. sciences. Voronezh Publishing house: VSU. 2013: 21 p. (In Russ.).

2. Gaponov S. P., D'yakova N. A., Slivkin A. I. The study of the characteristics of the accumulation of radionuclides by grass wormwood. Ways and forms of improving pharmaceutical education. *The creation of new physiologically active substances: Sat. scientific tr. Voronezh*. 2016; 232–236 (In Russ.).
3. Gaponov S. P., D'yakova N. A., Slivkin A. I. Peculiarities of accumulation of artificial and natural radionuclides by yarrow grass. Ways and forms of improving pharmaceutical education. *The creation of new physiologically active substances: Sat. scientific tr. Voronezh, CPI VSU*. 2016; 236–239 (In Russ.).
4. Tereshkina O. I., Rudakova I. P., Samylina I. A. Risk assessment of radionuclide contamination of medicinal plant materials. *Pharmacy*. 2011; 7: 3–6 (In Russ.).
5. Slivkin A. I., Gaponov S. P., Velikanova N. A. The study of the features of the accumulation of radionuclides from the soil medicinal plants *Polygonum aviculare* and *Plantago major*, growing in the city of Voronezh and its surroundings. Ways and forms of improving pharmaceutical education. *The creation of new physiologically active substances: Sat. scientific tr. Voronezh*. 2013; 510–513 (In Russ.).
6. Slivkin A. I., Gaponov S. P., Velikanova N. A. The study of the radiation safety of medicinal plants in the city of Voronezh and its surroundings on the example of highlander grass and plantain leaves. Ways and forms of improving pharmaceutical education. *The creation of new physiologically active substances: Sat. scientific tr. Voronezh*. 2013; 513–515 (In Russ.).
7. D'yakova N. A. Efficiency and radiation safety of medicinal plant material of the plantain large, collected in the Central Black Earth Region. *Drug development & registration*. 2018; 3 (24): 144–147 (In Russ.).
8. D'yakova N. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P. The study of radionuclide contamination of medicinal raw materials of the Voronezh region on the example of the leaves of the large plantain and nettle leaves. *Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2017; 2: 118–123 (In Russ.).
9. D'yakova N. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P., Samylina I. A. Assessment of radionuclide contamination of medicinal plant materials of the Voronezh region on the example of burdock root. *Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2016; 3: 110–115 (In Russ.).
10. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII ed. T. 1. / MZ RF. M., 2015; 1470 p. (In Russ.).
11. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII ed. T. 2. / MZ RF. M., 2015; 1003 p. (In Russ.).
12. D'yakova N. A., Samylina I. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P., Myndra A. A. Development and validation of rapid methods for the quantitative determination of water-soluble polysaccharides in burdock roots (*Arctium lappa* L.). *Chemical Pharmaceutical Journal*. 2015; 49 (9): 35–38 (In Russ.).
13. D'yakova N. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P., Mihajlovskaya I. Yu. The study of the dynamics of changes in the content of inulin in the roots of burdock (*Arctium lappa* L.) and dandelion (*Taraxacum officinale* Webb.) During the growing season. *Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2016; 4: 133–136 (In Russ.).
14. Velikanova N. A., Gaponov S. P., Slivkin A. I. Eco-assessment of medicinal plants in the urban environment of Voronezh. *LAMBERT Academic Publishing*. 2013; 211 p. (In Russ.).



DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-78-84  
УДК 615.457; 617.7-001.17; 617.7-001.4

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЛАЗНЫХ КАПЕЛЬ ЦИТОХРОМА С ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ГЛАЗ

Д. Ю. Ивкин<sup>1\*</sup>, П. В. Буренков<sup>2</sup>, А. С. Ивкина<sup>1</sup>, В. Е. Карев<sup>3</sup>, Е. И. Елецкая<sup>1</sup>, Е. Д. Семивеличенко<sup>1</sup>, Г. А. Плиско<sup>1</sup>

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

2 – ООО «Самсон-Мед», 196158, Санкт-Петербург, Московское шоссе, д. 13

3 – ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9

\* Контактное лицо: Ивкин Дмитрий Юрьевич. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Статья получена: 05.10.2018. Статья принята к печати: 15.01.2019

### Резюме

**Введение.** Цитохром С является метаболическим препаратом, который оказывает антигипоксическое, трофическое действие, стимулирует процессы регенерации и применяется в том числе при различных заболеваниях глаз.

**Цель.** Задачей работы являлось определение специфической активности глазных капель Цитохрома С в сравнении с эмоксипином.

**Материалы и методы.** В качестве тест-системы использованы кролики самцы породы советская шиншилла, проведено моделирование травматической эрозии и кислотного ожога с последующим применением испытуемых глазных капель. При формировании эрозии применяли метод С. Hanna, J. E. O'Brien (1960) с соскабливанием эпителия роговицы, кислотный ожог в эксперименте формировали под местной анестезией (0,4% инеокаином) аппликацией фильтровальной бумаги (в виде круга диаметром 8 мм), смоченной 3% раствором уксусной кислоты с экспозицией 5 секунд на роговицу. Оценка эффективности проведена на основании предложенной авторами балльной шкалы, позволяющей гистологически учесть изменения роговицы при патологическом процессе. В отношении всех количественных данных применялись методы описательной статистики: подсчитывались средние выборочные значения (M) и стандартные отклонения (SD). Распределение в каждой выборке данных анализировали при помощи критерия Шапиро-Уилка. При нормальном распределении использовали дисперсионный анализ с последующим апостериорным анализом (критерий Тьюки). В случае, если данные имели ненормальное распределение, рассчитывали критерий Краскела-Уоллиса.

**Результаты и обсуждение.** Состоятельность моделей травматической эрозии и кислотного ожога подтверждена гистологически. Терапевтическая эффективность глазных капель эмоксипина в полной дозе была недостаточно выраженной и сопоставимой с таковой у цитохрома С в половинной терапевтической дозе. Цитохром С в терапевтической и двойной терапевтической дозе эффективно справлялся с последствиями кислотного ожога и травматической эрозии при применении в форме глазных капель в течение 28 дней.

**Заключение.** Глазные капли Цитохром С, применяемые в терапевтической дозе и дозе, превышающей терапевтическую в 2 раза оказывают выраженный регенераторный эффект при травматической эрозии и кислотном ожоге роговицы глаза кролика. Эффект при применении глазных капель Цитохрома С в половинной терапевтической дозе, равно как и препарата сравнения (эмоксипин) в терапевтической дозе, выражен незначительно.

**Ключевые слова:** травматическая эрозия, кислотный ожог, Цитохром С, эмоксипин.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Ивкин Д. Ю., Буренков П. В., Ивкина А. С., Карев В. Е., Елецкая Е. И., Семивеличенко Е. Д., Плиско Г. А. Сравнительная эффективность глазных капель цитохрома С при экспериментальном повреждении глаз. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 78–84.

## COMPARATIVE EFFICIENCY OF CYTOCHROME C EYE DROPS DURING EXPERIMENTAL EYE DAMAGE

D. Yu. Ivkin<sup>1\*</sup>, P. V. Burenkov<sup>2</sup>, A. S. Ivkina<sup>1</sup>, V. E. Karev<sup>3</sup>, E. I. Eletskaia<sup>1</sup>, E. D. Semivelichenko<sup>1</sup>, G. A. Plisko<sup>1</sup>

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

2 – LLC «Samson-Med», 13, Moskovskoe shosse, St. Petersburg, 196158, Russia

3 – Federal Medical and Biological Agency Federal State Institution Scientific and Research Institute of Childrens Infections, 9, Professor Popov, str., 197022, Russia

\*Corresponding author: Dmitry Yu. Ivkin. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Received: 05.10.2018. Accepted: 15.01.2019

### Abstract

**Introduction.** Cytochrome C is a metabolic drug that has an antihypoxic, trophic effect, stimulates regeneration processes, and is also used in various eye diseases.

**Aim.** The task of the work was to determine the specific activity of cytochrome C eye drops in comparison with emoxipin.

**Materials and methods.** As a test system, Soviet chinchilla male rabbits were used, the simulation of traumatic erosion and acid burn was carried out, followed by the use of test eye drops. In forming erosion, the method of C. Hanna, J. E. O'Brien (1960) with scraping of the corneal epithelium, an acid burn in the experiment was formed under local anesthesia (0.4% incoain) application of filter paper (in the form of a circle with a diameter of 8 mm) moistened with 3% acetic acid solution with an exposure of 5 seconds on the cornea. The effectiveness evaluation was carried out on the basis of a scale proposed by the authors, which allows histologically to take into account corneal changes during the pathological process. Descriptive statistics methods were used for all quantitative data: the average sample values (M) and standard deviations (SD) were calculated. The distribution in each data sample was analyzed using the Shapiro – Wilk criterion. Under normal distribution, analysis of variance was used followed by a posteriori analysis (Tukey criterion). If the data had an abnormal distribution, the Kruskal-Wallis test was calculated.

**Results and discussion.** The integrity of the patterns of traumatic erosion and acid burn was histologically confirmed. The therapeutic efficacy of eye drops of emoxipin in the full dose was not sufficiently pronounced and comparable to that of cytochrome C in half the therapeutic dose. Cytochrome C in therapeutic and dual therapeutic dose effectively coped with the effects of acid burn and traumatic erosion when used in the form of eye drops for 28 days.

**Conclusion.** Cytochrome C eye drops, used at a therapeutic dose and a dose exceeding the therapeutic dose 2 times, have a pronounced regenerative effect in traumatic erosion and acid burn of the rabbit eye cornea. The effect of Cytochrome C eye drops at half the therapeutic dose, as well as the reference drug (emoxipin) at the therapeutic dose, is not very pronounced.

**Keywords:** traumatic erosion, acid burn, Cytochrome C, emoxipin.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Ivkin D. Yu., Burenkov P. V., Ivkina A. S., Karev V. E., Eletskaia E. I., Semivelichenko E. D., Plisko G. A. Comparative efficiency of cytochrome C eye drops during experimental eye damage. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 78–84.

## ВВЕДЕНИЕ

Цитохром С является метаболическим препаратом, который оказывает антигипоксическое, трофическое действие, стимулирует процессы регенерации. Является катализатором клеточного дыхания. Механизм действия препарата связан с наличием в простетической группе железа, способного переходить из окисленного состояния в восстановленное. В результате ускоряются эндогенные окислительно-восстановительные реакции и обменные процессы в тканях, улучшается утилизация кислорода и снижается гипоксия тканей при различных патологических состояниях [1, 2].

**Цель работы** – определение специфической активности глазных капель Цитохром С, 0,25%, при ежедневном (1 раз в день в течение 28 дней) конъюнктивальном введении в трех экспериментальных дозах самцам лабораторных кроликов после моделирования травматической эрозии и кислотного ожога глаз. В качестве препарата сравнения были использованы глазные капли Эмоксипин, 1%.

Оба препарата обладают антигипоксическим действием и относятся к группе препаратов, стимулирующих процессы регенерации тканей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат Цитохром С (таблица 1) в лекарственной форме капли глазные зарегистрирован на территории РФ и используется для комплексной терапии дистрофии и помутнения роговицы и кератита в стадии эпителизации (Регистрационный номер ЛП-000631).

**Таблица 1. Характеристика испытываемого препарата и препарата сравнения**

**Table 1. Characteristics of the test drug and the comparison drug**

| Характеристика                                  | Испытуемый препарат                                                                                                                           |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Торговое название, производитель, форма выпуска | Цитохром С (ООО «Самсон-Мед»), капли глазные 0,25%; флакон 2 мл с крышкой-капельницей                                                         |
| Рег. номер                                      | ЛП-000631                                                                                                                                     |
| МНН                                             | Цитохром С                                                                                                                                    |
| Активное вещество                               | Цитохром С                                                                                                                                    |
| Условия хранения                                | В сухом, защищенном от света месте, при температуре от 4 °С до 20 °С. Вскрытый флакон хранить в холодильнике не более 3 суток в закрытом виде |
| Характеристика                                  | Препарат сравнения                                                                                                                            |
| МНН, форма выпуска                              | Метилэтилпиридинола гидрохлорид, капли глазные 1%, флакон 5 мл с крышкой-капельницей                                                          |
| Тривиальное название                            | Эмоксипин                                                                                                                                     |
| Условия хранения                                | В защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С                                                                                     |

В качестве тест-системы были выбраны лабораторные кролики породы советская шиншилла (44 самца). Количество животных, использованных в исследовании, было достаточно для получения статистически достоверных результатов, и при этом было минималь-

ным по биоэтическим принципам. Лабораторные кролики являются стандартной тест-системой в опытах по изучению специфической активности глазных капель [3]. Имеющиеся на настоящий момент научные познания и утвержденные рекомендации не предоставляют приемлемых *in vitro* альтернатив к использованию лабораторных животных в качестве тест-системы в настоящем исследовании. Исследования на полноценном живом организме наиболее правильно и полно отражают всю динамику взаимодействий различных типов клеток, тканей и органов в организме человека [4].

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 г. № 51), Методическими указаниями по содержанию и использованию лабораторных животных (Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. – Washington, D.C., 1996) и Директивой 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, а также правилами, утвержденными Приказом Минздрава России от 01 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Животные в период карантина и эксперимента содержались по 1 особи в металлических клетках для кроликов типа Eurora BIOSCAPE с пластиковым поддоном (ZOONLAB, Германия) (размер пола клетки 73 x 73 см, высота отсека 52 см). Данные условия содержания соответствуют требованиям таблице 2.1. Директивы 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года. по охране животных (площадь пола клетки не менее 4200 см<sup>2</sup> и высота не менее 45 см для кроликов массой от 3 до 5 кг). Клетки оборудованы кормушками из нержавеющей стали, пластиковыми поилками и держателями этикеток. Подстил не использовался.

Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 17–23 °С и относительной влажности 30–70%. В комнатах содержания животных поддерживался 12 часовой цикл освещения и, по крайней мере, 10-ти кратная смена объема воздуха комнаты в час. Температура и влажность постоянно контролировались с помощью термогигрометров Microzele LP03.

Животные получали стандартный гранулированный корм «Полнораационный комбикорм для лабораторных кроликов и морских свинок» K-122, производства ООО «ЛАБОРАТОРКОРМ», Россия *ad libitum* в кормушку клетки. Животным давалась вода, соответствующая СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению

безопасности систем горячего водоснабжения», приготовленная методом фильтрации водопроводной воды через систему фильтров Аквафор. Питьевая вода давалась *ad libitum* в стандартных питьевых бутылочках с полной заменой воды 3 раза в неделю. Образцы воды были проанализированы на микробиологическое загрязнение и химические элементы. Анализ проводился в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту» с периодичностью 1 раз в квартал.

Период карантирования животных составил 14 дней до начала введения. Во время этого периода осуществлялся ежедневный ветеринарный осмотр и визуальный контроль потребления корма и воды. Животных с отклонениями в период карантина зарегистрировано не было. Перед началом исследования все животные, прошедшие карантинирование были включены в эксперимент и распределены на группы, которые формировали случайным образом, отклонение массы тела животных от среднего значения допускалось не более чем на 10%. В период карантина животные размещались в клетках, которые были идентифицированы карточкой, содержащей следующую информацию: пол и количество животных, дата получения, возраст/масса тела животных при получении, назначение животных. После карантина каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный идентификационный номер. Нумерация была сквозной – от 1-го до 44-го номера. Идентификационный номер был нанесён специальным нетоксичным маркером на внутреннюю поверхность уха животного. Каждая клетка была идентифицирована карточкой, содержащей следующую информацию: название исследования, номер исследуемой группы, пол и количество животных в клетке, а также индивидуальный номер животного.

Процедуры с животными были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПбХФА Минздрава России (Протокол № Rabbits-1/2-17 от 07.11.2017).

Оценка внешнего вида животных проводилась в рамках ежедневного ветеринарного осмотра в период карантина и проведения эксперимента. Клинический осмотр каждого животного на открытой площадке с обязательным офтальмологическим осмотром проводился при формировании групп, еженедельно в последующем на 8-й и 15-й, 22-й и 29-й дни после первого введения препаратов.

Осмотр подопытных животных в клетках содержания, с целью выявления смертности или признаков отклонения в состоянии здоровья, проводили ежедневно.

Массу тела регистрировали при формировании групп, непосредственно перед первым введением, еженедельно в ходе исследования.

Дизайн исследования был разработан на основании методик кислотного ожога и механической трав-

мы глаза кролика и инструкции по применению глазных капель Цитохром С.

Перед введением препаратов моделировали патологию глаз – травматическую эрозию (ТЭ) и кислотный ожог (КО). При формировании эрозии применяли метод С. Hanna, J.E. O'Brien (1960) [3], согласно которому под местной анестезией (закапывание раствора 0,4% инокаина) легким прижатием трепана с поршнем диаметром 8 мм на роговицу наносили метку, окрашенную 0,1% раствором флюоресцеина натрия. В пределах метки лезвием соскабливали эпителий роговицы. Дефект эпителия повторно окрашивали раствором флюоресцеина для того, чтобы отчетливее визуализировались форма и размер эрозии роговицы. Кислотный ожог в эксперименте формировали под местной анестезией (0,4% инокаином) аппликацией фильтровальной бумаги (в виде круга диаметром 8 мм), смоченной 3% раствором уксусной кислоты с экспозицией 5 секунд на роговицу [2].

Испытуемые препараты вводили животным ежедневно (1 раз в день в течение 28 дней) конъюнктивально, контрольное вещество не использовали. Данный путь введения аналогичен пути введения испытуемой ГЛФ человеку и применяется в клинической практике. Индивидуальный объём вводимой дозы для каждого животного был рассчитан исходя из значения массы тела полученного после последнего взвешивания. Процедуру введения препаратов проводили с помощью дозатора Biohit объемом 10–100 мкл и 100–1000 мкл.

В исследовании были использованы три дозы испытуемого препарата: минимальная – доза эквивалентная половине высшей суточной дозы для человека, средняя – доза эквивалентная высшей суточной дозы для человека и максимальная – доза, в 2 раза превышающая высшую суточную дозу для человека. Расчет доз препаратов для используемого вида тест-системы проводился по методике Freireich et al., 1966 [5], на основании данных инструкции по медицинскому применению.

Высшая терапевтическая доза испытуемого препарата (Доза 2) для кроликов = высшая терапевтическая доза для человека, согласно инструкции по применению (8 капель), умножить на коэффициент пересчета 3,2 (по методике Freireich) и разделить на средний вес человека 70 кг.

Высшая терапевтическая доза эмоксипина для кроликов = высшая терапевтическая доза для человека, согласно инструкции по применению (6 капель), умножить на коэффициент пересчета 3,2 (по методике Freireich) и разделить на средний вес человека 70 кг.

Доза 2 =  $8 \times 3,2 / 70 = 0,366$  капель/кг

Доза 1 =  $0,366 / 2 = 0,183$  капель/кг

Доза 3 =  $0,366 \times 2 = 0,73$  капель/кг

Доза эмоксипина =  $6 \times 3,2 / 70 = 0,274$  капель/кг

Из расчета, что 1 мл содержит 20 капель, объем 1 капли равен 0,05 мл = 50 мкл.



$$V_{\text{капли}} = \frac{1 \text{ мл} \cdot 1}{20}, \text{ мл.}$$

Следовательно, объем в мкл Доз для введения был равен:

Доза 2 = 0,366 капель/кг × 50мкл = 18,3 мкл/кг

Доза 1 = 0,183 капель/кг × 50мкл = 9,1 мкл/кг

Доза 3 = 0,73 капель/кг × 50мкл = 36,5 мкл/кг

Доза для эмоксипина = 0,274 капель/кг × 50 мкл = 13,7 мкл/кг

Дозировки рассчитаны на один глаз животного. Перед введением данный объем умножается на 2.

Были сформированы 11 групп животных по 4 особи в каждой группе. Всего 44 животных.

Первая группа – интактная, в которой находились животные без индукции патологии.

Вторая и третья группы состояли из животных, подвергшихся моделированию патологии (ТЭ и КО соответственно) без лечения.

Четвертая, шестая и восьмая группы – группы, в которых животные с ТЭ получали испытуемый препарат в исследуемых дозах.

Пятая, седьмая и девятая группы были сформированы из животных с КО, которые получали испытуемый препарат в исследуемых дозах.

10-я и 11-я группы – группы, состоящие из животных с патологией ТЭ и КО соответственно, которые получали препарат сравнения в терапевтической дозе.

**Таблица 2. Дизайн исследования специфической активности испытуемой ГЛФ при ежедневном (1 раз в день в течение 28 дней) конъюнктивальном введении лабораторным кроликам самцам**

**Table 2. Design of the study of the specific activity of the tested SFF with daily (1 time per day for 28 days) conjunctival administration to laboratory rabbits by males**

| № группы | n | Патология | Вещество   | Доза (мкл/кг)       |
|----------|---|-----------|------------|---------------------|
| 1        | 4 | Интактная | –          | –                   |
| 2        | 4 | ТЭ        | –          | –                   |
| 3        | 4 | КО        | –          | –                   |
| 4        | 4 | ТЭ        | Цитохром С | ½ ВТД (9,1 мкл/кг)  |
| 5        | 4 | КО        |            | ½ ВТД (9,1 мкл/кг)  |
| 6        | 4 | ТЭ        |            | ВТД (18,3 мкл/кг)   |
| 7        | 4 | КО        |            | ВТД (18,3 мкл/кг)   |
| 8        | 4 | ТЭ        |            | 2 ВТД (36,5 мкл/кг) |
| 9        | 4 | КО        |            | 2 ВТД (36,5 мкл/кг) |
| 10       | 4 | ТЭ        | эмоксипин  | ВТД (13,7 мкл/кг)   |
| 11       | 4 | КО        |            | ВТД (13,7 мкл/кг)   |

На 29 день после начала введения препаратов животные подвергались эвтаназии путем наркотизации углекислым газом в CO<sub>2</sub>-боксе с последующим извлечением глазных яблок, которые фиксировали в 10% нейтральном формалине.

Гистологическому исследованию подвергались структуры передних отделов глазных яблок всех животных. После стандартной гистологической проводки и имбибиции парафином с помощью ротационного микротомы были изготовлены срезы ткани толщиной

4 мкм, помещенные на предметные стекла, окрашенные гематоксилином и эозином и заключенные под покровные стекла. Гистологические препараты изучались в проходящем свете при суммарном увеличении микроскопа ×100, ×200 и ×400.

В отношении всех количественных данных применялись методы описательной статистики: подсчитывались средние выборочные значения (М) и стандартные отклонения (SD), согласно рекомендациям Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [3].

Распределение в каждой выборке данных анализировали при помощи критерия Шапиро-Уилка. При нормальном распределении использовали дисперсионный анализ с последующим апостериорным анализом (критерий Тьюки). В случае, если данные имели ненормальное распределение, рассчитывали критерий Краскела-Уоллиса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все животные переносили введение удовлетворительно: процедура не сопровождалась какими-либо негативными признаками болезненности. Гибели на протяжении 28-и суток от момента первого введения препаратов не наблюдалось.

### Внешний вид

По результатам проведенного клинического осмотра было выявлено, что изменения в поведении, общем состоянии и состоянии нервной системы на протяжении эксперимента у животных отсутствовали. После индукции патологии (как КО, так и ТЭ) поведение животных не изменялось. Было отмечено, что животные опытных групп выглядели так же, как и животные контрольной группы. Отличий в поведении животных между группами не выявлено на протяжении всего эксперимента.

У всех подопытных животных нос был умеренно влажный, патологические выделения отсутствовали. Уши бледно-розовые, обычной температуры, нагноений, воспаления, загрязнений за весь период наблюдения ни у кого отмечено не было. Зубы у всех сохранены. Дыхание в целом было нормальным у всех экспериментальных животных, признаков одышки отмечено не было.

Шерсть у всех животных опрятная, блестящая, без очагов облысения. Тонус мускулатуры у всех животных был нормальным. Видимые слизистые оболочки бледно-розовой окраски, блестящие. Деформации или отека конечностей нет. Кожа без признаков раздражения или воспаления. Половые органы самцов правильно выражены.

Все животные нормального телосложения, удовлетворительного питания. У 100% кроликов всех групп двигательная активность была в норме. В целом поведение было стандартным. Кровотечений у животных не наблюдали.

В ходе офтальмологического осмотра было отмечено, что на этапе формирования групп роговица глаз у всех кроликов находилась в состоянии нормы. После моделирования патологии у групп кроликов с КО наблюдалось помутнение роговицы, отек и слизистое нагноение (рисунок 1А), а животные с ТЭ характеризовались наличием слезотечения и светобоязни, а также зеленоватым оттенком роговицы глаза после взаимодействия белков раневой поверхности с флуоресцеином (рисунки 1Б, 1В).



Рисунок 1. 1А – последствия кислотного ожога на следующий день после моделирования; 1Б – взаимодействие поверхности эрозии с флуоресцеином; 1В – последствия травматической эрозии на следующий день после моделирования

Figure 1. 1А – the effects of acid burn on the day after the simulation; 1Б – interaction of the erosion surface with fluorescein; 1В – the effects of traumatic erosion on the day after modeling

В течение первой недели введения препаратов Цитохром С и эмоксипина значимых различий визуально не наблюдалось – глазная щель была сужена, отмечались нагноения, которые удаляли ватой, смоченной в изотоническом растворе.

К концу второй недели размер глазной щели у кроликов пришел в норму у большинства животных. Нагноительные процессы структур глазных яблок были слабой степени выраженности у животных, получавших глазные капли Цитохром С в дозе 2 ВТД.

В течение третьей недели определить визуально наличие патологии стало невозможно у животных, которым вводили Цитохром С в дозах ВТД и 2ВТД, а также у половины животных, получавших препарат сравнения и Цитохром С в дозе 1/2ВТД.

К окончанию эксперимента визуальное состояние глаз всех животных без исключения пришло в норму.

### Масса тела

Оценка динамики массы тела кроликов показала, что ежедневное (1 раз в день в течение 28 дней) конъюнктивальное введение животным испытуемого препарата и препарата сравнения не оказало влияния на данный показатель. Масса тела кроликов равномерно увеличивалась в течение всего периода наблюдения. В период наблюдения животные потребляли корм и воду в рамках физиологических потребностей.

### Гистологическое исследование

Гистологической оценке подвергались глазные яблоки всех животных.

В 28 случаях значимой патологии выявлено не было:

Роговица состоит из пяти слоев, многослойный плоский эпителий обычного строения, сосуды не определяются, патологической клеточной инфильтрации не выявлено (рисунок 2.1).

Строение радужки, ресничного тела не нарушено (рисунок 2.2).

Лимб обычного строения, с минимально выраженной лимфо-гистиоцитарной инфильтрацией (рисунок 2.3).

Склера, сосудистая, сетчатая оболочка нормального строения.

В 16 случаях выявлены следующие патологические изменения (отражены от наименее к наиболее выраженным):

5,6 (травматическая эрозия без лечения) – выраженная распространенная фибропластическая реакция роговицы с ее утолщением (рисунок 2.4) в одном из глазных яблок.

9-12 (кислотный ожог без лечения), 16 (травматическая эрозия + цитохром С, 1/2ВТД), 17, 19 (кислотный ожог + цитохром С, 1/2ВТД), 42 (кислотный ожог + эмоксиоптик), 44 (кислотный ожог + эмоксиоптик) – очаговая гипертрофия структур роговицы с ее очаговым утолщением (рисунок 2.5) в одном из глазных яблок.

41 (кислотный ожог + эмоксипин) – очаговая гипертрофия структур роговицы с ее очаговым утолщением в двух глазных яблоках.

7 (травматическая эрозия без лечения) – слабо выраженный кератит и слабо выраженная патологическая васкуляризация роговицы (рисунок 2.6) в одном из глазных яблок.

8 (травматическая эрозия без лечения) – тяжелый язвенный кератит с выраженной экссудативной клеточной реакцией (рисунок 2.7), очаговый экссудативный иридоциклит (рисунок 2.8) в одном из глазных яблок.

39 (травматическая эрозия+эмокси-оптик) – распространенный экссудативный кератит с фокусами некроза (рисунок 2.9), слабо выраженный очаговый экссудативный иридоциклит в одном из глазных яблок.

40 (травматическая эрозия + эмоксипин) – распространенный экссудативный кератит с фокусами некроза в одном из глазных яблок (рисунок 2.10), слабо выраженный кератит и слабо выраженная патологическая васкуляризация роговицы в другом глазном яблоке.

Для объективизации морфологических изменений роговицы при травматической эрозии и кислотном ожоге была использована полуколичественная шкала характера и степени выраженности патологического процесса. В качестве критериев учитывались наличие или отсутствие патологических изменений, наличие и выраженность текущего экссудативного воспаления (с последующей патологической васкуляризацией роговицы), наличие и распространенность фибропластических изменений роговицы процесса (как проявления обратного развития патологического процесса и организации в его исходе) (таблица 3). Распределение

Таблица 3. Классификация патологического процесса в баллах

Table 3. Classification of the pathological process in points

| Классификация патологического процесса в баллах | Нет патологии (0 баллов) | Фибропластическая реакция роговицы с формированием ограниченного (1 балл) или обширного (2 балла) рубца | Кератит разной степени выраженности (от слабо выраженного (3 балла), средней степени выраженности (4 балла), до тяжелого язвенного (5 баллов)) |
|-------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Баллы, № жив                                    | 0                        | 1 балл: 9, 10, 11, 12, 16, 17, 19, 41 (оба глаза), 42, 44<br>2 балла: 5, 6;                             | 3 балла: 7; 39(1 глаз)<br>4 балла: 39 (2 глаз), 40;<br>5 баллов: 8;                                                                            |

патологических изменений, отраженных в баллах при различных стратегиях терапии отражено в таблице 4.

Таким образом, интерпретируя результаты исследования можно сделать следующие выводы:

А) состоятельность моделей травматической эрозии и кислотного ожога подтверждена гистологически [9].

Б) терапевтическая эффективность глазных капель эмоксипина в полной дозе была недостаточно выраженной и сопоставимой с таковой у цитохрома С в 1/2ТД.

В) Цитохром С в терапевтической и двойной терапевтической дозе эффективно справлялся с последствиями КО и ТЭ при применении в форме глазных капель в течение 28 дней.

Таблица 4. Распределение патологических изменений в баллах при различных стратегиях терапии

Table 4. Distribution of pathological changes in the scores with different treatment strategies

| Группа № | Патология | Препарат, доза   | Распределение патологического процесса по баллам, n глаз |   |   |   |   |   | Сумма баллов оценки патологического процесса |
|----------|-----------|------------------|----------------------------------------------------------|---|---|---|---|---|----------------------------------------------|
|          |           |                  | 0                                                        | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |                                              |
| 1        | Интакт    | –                | 8                                                        | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0                                            |
| 2        | ТЭ        | –                | 4                                                        | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 12                                           |
| 3        | КО        | –                | 4                                                        | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4                                            |
| 4        | ТЭ        | Цитохром С ½ ВТД | 7                                                        | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1                                            |
| 5        | КО        | Цитохром С ½ ВТД | 6                                                        | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2                                            |
| 6        | ТЭ        | Цитохром С ВТД   | 8                                                        | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0                                            |
| 7        | КО        | Цитохром С ВТД   | 8                                                        | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0                                            |
| 8        | ТЭ        | Цитохром С 2ВТД  | 8                                                        | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0                                            |
| 9        | КО        | Цитохром С 2ВТД  | 8                                                        | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0                                            |
| 10       | ТЭ        | Эмоксипин ВТД    | 5                                                        | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 11                                           |
| 11       | КО        | Эмоксипин ВТД    | 4                                                        | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4                                            |

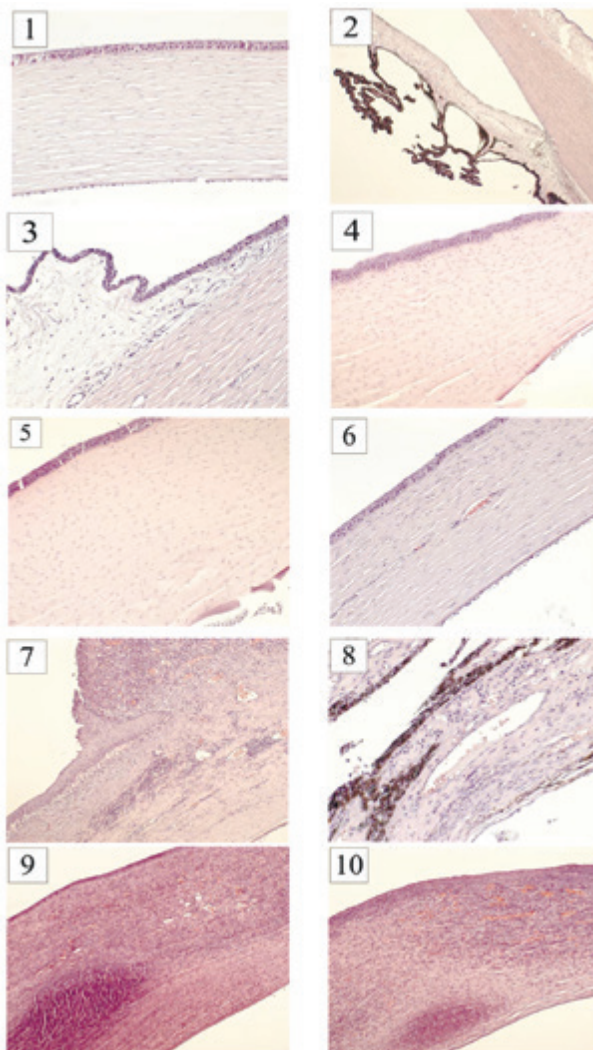


Рисунок 2. Гистологическое исследование глаз кроликов, окраска гематоксилином и эозином: 1 – интактная роговица, ув.  $\times 100$ ; 2 – интактная радужная оболочка, ув.  $\times 50$ ; 3 – обычное строение лимба, ув.  $\times 100$ ; 4 – утолщение роговицы за счет обширной фибропластической реакции. Утолщение эпителиальной выстилки роговицы, ув.  $\times 100$ ; 5 – утолщение роговицы за счет обширной фибропластической реакции. Утолщение эпителиальной выстилки роговицы, ув.  $\times 100$ ; 6 – слабо выраженная патологическая васкуляризация роговицы, ув.  $\times 100$ ; 7 – тяжелый язвенный кератит с выраженной экссудативной клеточной реакцией, разрастанием грануляционной ткани и обильной патологической васкуляризацией роговицы, ув.  $\times 100$ ; 8 – очаговый экссудативный иридоциклит, ув.  $\times 200$ ; 9 – распространенный экссудативный кератит с фокусом некроза и патологической васкуляризацией роговицы, ув.  $\times 100$ ; 10 – распространенный экссудативный кератит с фокусом некроза и патологической васкуляризацией роговицы, ув.  $\times 100$

Figure 2. Histological examination of the eyes of rabbits, stained with hematoxylin and eosin: 1 – intact cornea, SW.  $\times 100$ ; 2 – intact iris, SW.  $\times 50$ ; 3 – the usual structure of the limb, SW.  $\times 100$ ; 4 – corneal thickening due to extensive fibroplastic reaction. Thickening of the epithelial lining of the cornea, SW.  $\times 100$ ; 5 – cornea thickening due to extensive fibroplastic reaction. Thickening of the epithelial lining of the cornea, SW.  $\times 100$ ; 6 – mild pathological corneal vascularization, SW.  $\times 100$ ; 7 – severe ulcerative keratitis with severe exudative cellular reaction, proliferation of granulation tissue and abundant pathological corneal vascularization, SW.  $\times 100$ ; 8 – focal exudative iridocyclitis, SW.  $\times 200$ ; 9 – common exudative keratitis with a focus of necrosis and pathological corneal vascularization, SW.  $\times 100$ ; 10 – common exudative keratitis with necrosis focus and pathological corneal vascularization, SW.  $\times 100$



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных, в т.ч. гистологического исследования, было выявлено, что глазные капли Цитохром С, применяемые в терапевтической дозе и дозе, превышающей терапевтическую в 2 раза оказывают выраженный регенераторный эффект при травматической эрозии и кислотном ожоге роговицы глаза кролика. Эффект при применении глазных капель Цитохрома С в половинной терапевтической дозе, равно как и препарата сравнения (эмоксипин) в терапевтической дозе, выражен незначительно.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ивкин Д. Ю., Оковитый С. В. Патогенетическая терапия состояний гипоксии органов и тканей на клеточном уровне. *Лечащий врач*. 2017; 7: 11–15.
2. Официальная инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Цитохром С (капли глазные). Available at: <http://samsonmed.ru/catalog/tsitokhrom-s-kapli-glaznye-0-25>. (accessed 13.11.2017).
3. Канюков В. Н., Стадников А. А., Трубина О. М., Яхина О. М. Экспериментальное моделирование травматических повреждений роговицы. *Вестник ОГУ*. 2014; 12 (173): 156–159.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: *Гриф и К*, 2012; 944 с.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях под ред.: Н. Н. Каркищенко и С. В. Грачева. М.: *Профиль-2С*, 2010; 358 с.
6. Freireich E. J., Gehan E. A., Rail D. P. et al. *Cancer Chemother. Rep.* 1966; 50(4): 219–244.
7. Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers: Exploratory IND Studies, U.S. F.D.A. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2006 Jan.
8. Position Statement on the Use of Animals in Research, 1993 Feb 26; *NIH Guide* 22(8).
9. Ивкина А. С., Ивкин Д. Ю., Семивеличенко Е. Д., Плиско Г. А., Буренков П. В. Моделирование травматических повреждений роговицы глаза. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018; 2: 30–37.

## REFERENCES

1. Ivkin D.Yu., Okovity S.V. Pathogenetic therapy of hypoxia of organs and tissues at the cellular level. *Attending physician*. 2017; 7: 11–15 (In Russ.).
2. Official instructions for the medical use of the drug Cytochrome C (eye drops). Available at: <http://samsonmed.ru/catalog/tsitokhrom-s-kapli-glaznye-0-25>. (accessed 13.11.2017).
3. Kanyukov V. N., Stadnikov A. A., Trubina O. M., Yakhina O. M. Experimental modeling of traumatic corneal damage. *Bulletin of OSU*. 2014; 12(173): 156(In Russ.).159 (In Russ.).
4. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. M.: *Grief and K*, 2012; 944 p. (In Russ.).
5. Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical technologies. Ed.: N.N. Karkishchenko and S.V. Grachev. M.: *Profil-2S*, 2010: 358 p. (In Russ.).
6. Freireich E.J., Gehan E.A., Rail D.P. et al. *Cancer Chemother. Rep.* 1966; 50(4): 219–244.
7. Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers: Exploratory IND Studies, U.S. F.D.A. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2006 Jan.
8. Positioning of Animals in Research, 1993 Feb 26; *NIH Guide* 22 (8).
9. Ivkina A. S., Ivkin D. Yu., Semivlichenko E. D., Plisko G. A., Burenkov P. V. Simulation of traumatic corneal damage. *Laboratory animals for scientific research*. 2018; 2: 30–37 (In Russ.).

# XIV НАЦИОНАЛЬНЫЙ КОНГРЕСС С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

## «РАЗВИТИЕ ФАРМАКОЭКОНОМИКИ И ФАРМАКОЭПИДЕМИОЛОГИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ» — «ФАРМАКОЭКОНОМИКА 2019»

**2–3 апреля 2019 г., Самара**  
**гостиница Holiday Inn Samara**



Министерство здравоохранения Самарской области  
Агентство оценки технологий здравоохранения  
Журнал «Фармакоэкономика: теория и практика»

### ОРГАНИЗАТОР:

Московское фармацевтическое общество  
Конгресс Центр

## ПРОГРАММА КОНГРЕССА

### ОТКРЫТИЕ КОНГРЕССА

Ратманов М.А. — министр здравоохранения Самарской области

### ПАНЕЛЬНАЯ ДИСКУССИЯ

- Клинико-экономическая оценка и возможности клинического фармаколога на региональном уровне. Что можно сделать своими силами, а что лучше делегировать экспертным организациям?

### СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ СЕССИИ ТЕМАТИЧЕСКИЕ БЛОКИ

- Лекарственное обеспечение наиболее затратных нозологий, финансируемых за счет федерального и регионального бюджета
- Организация лекарственного обеспечения и фармакоэкономика в онкологии
- Организация лекарственного обеспечения и фармакоэкономика сахарного диабета
- Организация лекарственного обеспечения и фармакоэкономика бронхиальной астмы

### ВЫЕЗДНОЕ ЗАСЕДАНИЕ

- Заседание межрегиональной рабочей группы «Современная организация лекарственного обеспечения — СОЛО» (Участвуют представители региональных органов управления здравоохранением)

### ПОДВЕДЕНИЕ ИТОГОВ КОНКУРСА МОЛОДЫХ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ ПО ФАРМАКОЭКОНОМИКЕ НА ЛУЧШУЮ НАУЧНУЮ РАБОТУ 2019 ГОДА

Первая премия — публикация полной научной статьи в журнале «Фармакоэкономика: теория и практика» в 2019 году с размещением на сайте журнала [www.pharmacoeconom.com](http://www.pharmacoeconom.com)

Вторая премия — бесплатная аккредитация с публикацией тезисов на следующий XV конгресс

«Развитие фармакоэкономики и фармакоэпидемиологии» в 2020 году

Третья премия — бесплатная подписка на 2019 год на печатный вариант журнала «Фармакоэкономика: теория и практика» по каталогу «Почта России», подписной индекс 92646

**Авторитетный профильный Конгресс, исторически основанный на результатах отечественных российских фармакоэкономических исследований, пройдет уже в четырнадцатый раз. Это единственная профильная площадка для обмена практическим опытом, в которой примут участие ведущие отечественные специалисты в области фармакоэкономики, руководители и ведущие специалисты федеральных и региональных органов управления здравоохранением и фармацевтической деятельностью, представители аптечных организаций, лечебно-профилактических учреждений, профессиональных фармацевтических ассоциаций, высших учебных заведений, предприятий-производителей лекарственных средств, отраслевой прессы и др.**

Дополнительная информация на сайте [www.fru.ru](http://www.fru.ru)

и по тел.: (495) 359-06-42, 359-53-38, e-mail: [fru@fru.ru](mailto:fru@fru.ru), skype: fru2012

Обращаем Ваше внимание, что Оргкомитет конгресса оставляет за собой право вносить изменения в программу и состав докладчиков

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-86-90  
УДК 615.21:547.5

## ИЗУЧЕНИЕ НООТРОПНОЙ И АНТИГИПОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ 5-АМИНО-ЭКЗО-3-АЗАТРИЦИКЛО[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]ДЕКАН-4-ОНА

Т. А. Сапожникова<sup>1\*</sup>, Н. С. Макара<sup>1</sup>, С. Ф. Габдрахманова<sup>1</sup>, Р. Ю. Хисамутдинова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – Уфимский Институт химии – обособленное структурное подразделение ФГБНУ УФИЦ РАН, 450054, Россия, г. Уфа, пр. Октября, 71

\*Контактное лицо: Сапожникова Т. А. E-mail: newpharm@anrb.ru

Статья получена: 10.10.2018. Статья принята к печати: 00.01.2019

### Резюме

**Введение.** Ноотропные препараты являются компонентами комплексной терапии при различных неврологических дисфункциях. Одним из классов НП являются производные пирролидона, которые помимо прямого влияния на когнитивные функции, повышают устойчивость мозга к гипоксии.

**Цель.** Данной работы было изучение влияния нового производного 3-аминопирролидин-2-она, содержащего норборнанный фрагмент (P-11), на различные фазы памяти у крыс и оценка его противогипоксических свойств.

**Материалы и методы.** Влияние P-11 на память оценивали на модели выработки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) у крыс. Противогипоксические свойства P-11 изучали на модели острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией, оценивая продолжительность жизни лабораторных животных и уровень процессов липопероксидации в головном мозге.

**Результаты и обсуждения.** Было показано, что введение P-11 на разных этапах выработки УРПИ улучшает способность животных к обучению и извлечению памятного следа о болевом раздражении через 24 часа после выработки рефлекса. На модели нормобарической гипоксии при однократном введении P-11 проявил тенденцию к увеличению продолжительности жизни, а при 14-дневном введении наблюдали выраженные антигипоксические свойства по сравнению с другими производными пирролидона – пирacetамом и фенотропилом, проявляющиеся в увеличении времени выживания мышей, а также в понижении процессов ПОЛ в ткани головного мозга.

**Заключение.** Таким образом, было показано, что новое производное 3-аминопирролидин-2-она обладает ноотропными и антигипоксическими свойствами.

**Ключевые слова:** 5-амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-он, ноотропная активность, условный рефлекс пассивного избегания, антигипоксическая активность, нормобарическая гипоксия.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Сапожникова Т. А., Макара Н. С., Габдрахманова С. Ф., Хисамутдинова Р. Ю. Изучение ноотропной и антигипоксической активности 5-амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-она. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 86–90.

## STUDY OF NOOTROPIC AND ANTI-HYPOXIC ACTIVITY OF 5-AMINO-3-EXO-AZATRICYCLO[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]DECAN-4-ON

T. A. Sapozhnikova<sup>1\*</sup>, N. S. Makara<sup>1</sup>, S. F. Gabdrakhmanova<sup>1</sup>, R. Yu. Khisamutdinova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – Ufa Institute of the Chemistry – Subdivision Ufa Federal Research Centre RAS, Oktyabrya av., 71, Ufa, 450054, Russia

\*Corresponding author: T. A. Sapozhnikova. E-mail: newpharm@anrb.ru

Received: 10.10.2018. Accepted: 00.01.2019

### Abstract

**Introduction.** Nootropic drugs are components of complex therapy for various neurological dysfunctions. One of the classes of ND are pyrrolidone derivatives, which, in addition to a direct effect on cognitive functions, increase the brain's resistance to hypoxia.

**Aim.** The work was to study the effect of the 3-aminopyrrolidin-2-one derivative containing the norbornane fragment (P-11) on different memory phases in rats and to evaluate its antihypoxic properties.

**Materials and methods.** The effect of P-11 on memory was assessed on passive avoidance test (PAT) in rats. The antihypoxic properties of P-11 were studied on a model of acute normobaric hypoxia with hypercapnia, assessing the life span of laboratory animals and the level of lipid peroxidation processes in the brain.

**Results and discussion.** It was shown that the introduction of P-11 at different stages of the development of passive avoidance reaction improves the ability of animals to learn and extract a memorable trace of pain stimulation 24 hours after the development of a reflex. On a model of normobaric hypoxia with a single injection, P-11 showed a tendency to increase the life span of rats relative to the control, and with a 14-day treatment, pronounced antihypoxic properties were observed compared with other pyrrolidone derivatives, pyracetam and phenotropil, which manifested in an increase in life span of mice, as well as in lowering lipid peroxidation processes in brain tissue.

**Conclusion.** Thus, it was shown that a new derivative 3-aminopyrrolidin-2-one exhibits nootropic and antihypoxic properties.

**Keywords:** 5-amino-3-exo-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-on, activity, nootropic activity, passive avoidance task, antihypoxic activity, normobaric hypoxia.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Sapozhnikova T. A., Makara N. S., Gabdrakhmanova S. F., Khisamutdinova R. Yu. Study of nootropic and anti-hypoxic activity of 5-amino-3-exo-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-on. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 86–90.

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из компонентов комплексной терапии неврологических дисфункций являются ноотропные препараты (НП), которые улучшают физиологические процессы, связанные с памятью, вниманием и обучением [6, с. 1795, 1797–1798]. НП востребованы при реабилитации после инсультов, хронической церебро-

васкулярной недостаточности (включая сосудистую деменцию), при черепно-мозговых травмах, при поражениях мозга нейродегенеративного характера, болезни Альцгеймера, нарушениях функций головного мозга, вызванных алкоголизмом, острых нейроинфекциях и др. [5, с. 565]. Основная область применения ноотропов у здоровых людей – это профилактика стрессов и поддержание работоспособности в критических



ситуациях, при повышенных физических и интеллектуальных нагрузках [7, с. 910].

В качестве НП в клинической практике применяют препараты различных классов, среди них – производные пирролидона, представителем которых является пирацетам (2-оксо-1-пирролидинилацетамид) – первый синтетический препарат ноотропного действия, и его производное фенотропил (N-карбамоил-метил-4-фенил-2-пирролидон), которые, помимо собственно ноотропного действия, повышают устойчивость тканей мозга к гипоксии и токсическим воздействиям, фенотропил также обладает противосудорожным действием и анксиолитической активностью [6, с. 1795; 4, с. 407]. Целью данной работы было изучение влияния нового производного 3-аминопирролидин-2-она, содержащего норборнанный фрагмент (P-11), синтезированного в УФИХ РАН (лаборатория биоорганической химии и катализа зав. лаб., д.х.н. В. А. Докичев) на различные фазы памяти на модели выработки УРПИ у крыс и на продолжительность жизни мышей и крыс в условиях нормобарической гипоксии. Ранее были показаны его антиаритмические свойства и изучена субхроническая токсичность [5, с. 9; 4, с. 90].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на 112 взрослых крысах и крысках линии Вистар обоего пола массой 170–200 г и 60 г и на 40 беспородных белых мышьях-самцах массой 18–20 г (питомник лабораторных животных «Рапполово», Санкт-Петербург). Животных содержали в стандартных условиях вивария, на стандартном рационе. Этические принципы обращения с лабораторными животными соблюдали согласно «European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123».

Влияние P-11 на различные фазы памяти изучали на модели выработки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) у крыс [2, с. 279]. Метод состоял из двух этапов: обучение навыку и воспроизведение его сохранности. Воспроизведение навыка УРПИ осуществляли через 24 часа после обучения – регистрировали латентный период первого захода, количество заходов в темный отсек, а также общее время нахождения в темном отсеке. P-11 и препарат сравнения пирацетам (Облфарм, Россия, таблетки, 800 мг, серия 60216, срок годности до 03.2019) вводили перорально: за 1 час до обучения (влияние на процесс ввода и первоначальной обработки информации). При изучении влияния на процессы консолидации и воспроизведения информации, P-11 и препарат сравнения вводили непосредственно после обучения и за 30 минут до воспроизведения навыка. Контрольные животные получали физиологический раствор в эквиваленте. Через 24 часа регистрировали латентный период первого захода в темный отсек и процент животных, не вошедших в темный отсек. P-11 вводили в дозах 23 мг/кг (1/30 от ЛД<sub>50</sub>) и 46 мг/кг (1/15 от ЛД<sub>50</sub>) препарат сравнения пирацетам – в дозе 400 мг/кг [5, с. 566].

Противогипоксические свойства P-11 изучали на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией («баночная» гипоксия) [2, с. 285]. Для этого мышь или крысенка помещали в стеклянную емкость объемом 200 см<sup>3</sup>, которую герметично закрывали, при этом происходило постепенное снижение содержания кислорода и повышение рСО<sub>2</sub> в воздухе за счет дыхания животного. Регистрировали время выживания животного в условиях гипоксии (в минутах) и выражали в процентах относительно контроля. P-11 и препараты сравнения – фенотропил (Valenta, Россия, таблетки 100 мг, серия 150614, срок годности 07.2019) и пирацетам (Облфарм, Россия, таблетки, 800 мг, серия 60216, срок годности до 03.2019) вводили профилактически перорально по двум схемам: однократно, за час до эксперимента, и в течение 14 дней до эксперимента. При разовом введении доза P-11 составила 23 мг/кг, препаратов сравнения – 100 мг/кг. При курсовом введении суточная доза P-11 и препаратов сравнения составила – 3 мг/кг (исходя из суточной терапевтической дозы фенотропила 200 мг для взрослого человека массой 70 кг). Суммарная доза за 14 дней составила 42 мг/кг. На 15-й день после воспроизведения гипоксии, животных декапитировали, головной мозг извлекали и гомогенизировали в физиологическом растворе. Об активности процессов липопероксидации судили по уровню малонового диальдегида (МДА), определяемого общепринятым спектрофотометрическим методом [3, с. 66–68].

Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакета Statistica 10 фирмы StatSoft. Данные представлены как средние и их средние ошибки (M±m). Для оценки достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента, эффект считали достоверным при p<0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По полученным данным, соединение P-11 в исследуемых дозах улучшало обучаемость животных, позитивно влияя на процессы ввода и первоначальной обработки информации. Наиболее выраженный ноотропный эффект наблюдали в дозе 23 мг/кг (1/30 от ЛД<sub>50</sub>). У животных данной группы увеличилось время латентного периода первого захода в темный отсек и уменьшилось время пребывания в темном отсеке и количество заходов в темный отсек по сравнению с дозой 46 мг/кг и группой контроля (p<0,001) (таблица 1).

В эксперименте по изучению влияния P-11 на процесс консолидации памяти на этапе обучения рефлексу время латентного периода первого захода в темный отсек было статистически незначимо между группами и составило в контроле – 11,1±1,75 с, в группе пирацетама – 9,9±1,92 с и в группе P-11 – 10,8±1,38 с. Через 24 часа на этапе проверки выработанного рефлекса в контрольной группе время латентного периода первого захода в темный отсек было 4,5±2,89 с. Введение P-11 в дозе 23 мг/кг сразу после обучения увеличивало латентный период первого захода в темный отсек в 29 раз (p<0,01) по сравнению с контролем и было статис-

Таблица 1. Влияние 5-амино-экс-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-она на процесс ввода и первоначальной обработки информации в тесте УРПИ у крыс, М±m, (n=8)

Table 1. The effect of 5-amino-exo-3-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-ol on the input process and the initial processing of information in the passive passive magnetic test in rats, M±m, (n=8)

| Группы               | Первый день (обучение) |                    | Второй день (воспроизведение) |                    |                          |
|----------------------|------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------------|
|                      | Латентный период, с    | Количество заходов | Латентный период, с           | Количество заходов | Время в темной камере, с |
| Контроль             | 17,4±2,9               | 1,4±0,2            | 2,0±0,6*#                     | 2,8±0,2*#          | 191,0±30,5**             |
| Пирацетам, 400 мг/кг | 16,2±2,3               | 1,0±0,2            | 239,0±11,8**                  | 0,6±0,1**          | 30,0 ± 6,3**             |
| P-11, 23 мг/кг       | 28,0±3,8               | 1,2±0,2            | 192,8±7,4**                   | 0,9±0,2**          | 52,5±17,7**              |
| P-11, 46 мг/кг       | 10,1±0,8               | 1,4±0,2            | 66,4±2,7**                    | 1,2±0,4**          | 69,8±11,7**              |

Примечание: \* – p<0,001 – по сравнению с контролем; \*\* – p<0,01 – по сравнению с контролем; # – p<0,001 – по сравнению с исходными данными.

тически незначимо ниже (132,5±14,3 с p>0,05) времени латентного периода группы пирацетама (143,1±12,5 с) (рисунок 1). Животных, не вошедших в темный отсек, было больше всего в группах пирацетама и P-11 (50% и 37,5% соответственно), в группе контроля – 12,5%.

с пирацетамом (60,7±4,23 с). Данные соединения увеличивали латентное время первого захода в 18,5 раза (p<0,01) и 16,4 раза (p<0,01) по сравнению с контролем (рисунок 2). Количество животных, не вошедших в темный отсек в группе P-11 было 63%, в группе пирацетама – 25%. В группе контроля не вошедших животных не наблюдали.

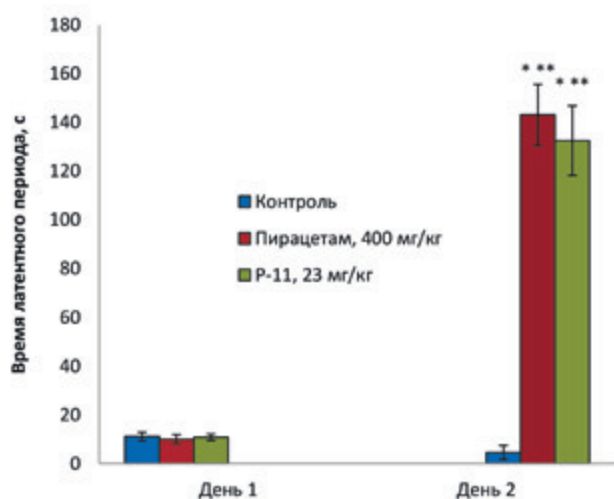


Рисунок 1. Время латентного периода первого захода в темный отсек (секунды) в первый день обучения и через 24 часа. При введении P-11 после процедуры обучения (действие на процесс консолидации памяти у крыс), (M±m); \* – p<0,01 – данные достоверны относительно контроля; \*\* – p<0,01 – данные достоверны относительно дня обучения. Количество животных в группе – 8

Figure 1. The time of the latent period of the first entry into the dark compartment (seconds) on the first day of training and after 24 hours. With the introduction of P-11 after the learning procedure (effect on the process of memory consolidation in rats), (M±m); \* – p<0.01 – data are reliable relative to the control; \*\* – p<0.01 – data are reliable relative to the day of study. The number of animals in the group – 8

В эксперименте по изучению влияния P-11 на процесс воспроизведения информации, на этапе обучения, время латентного периода первого захода в темный отсек в группах контроля, пирацетама и P-11 было 13,4±2,94 с, 17,1±2,31 с и 12,7±1,09 с соответственно, данные статистически незначимы. Через 24 ч на этапе воспроизведения условного рефлекса в группе контроля латентное время составило 3,7±1,83 с. P-11 проявил более выраженный эффект (68,3±3,98 с) по сравнению

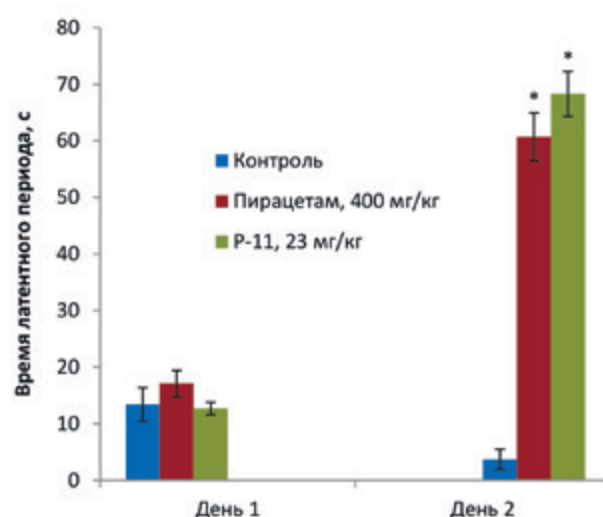


Рисунок 2. Время латентного периода первого захода в темный отсек в первый день обучения и через 24 часа при введении P-11 перед воспроизведением навыка (действие на процесс воспроизведения информации о болевом раздражении у крыс), (M±m); \* – p<0,01 – данные достоверны относительно контроля. Количество животных в группе – 8

Figure 2. The time of the latent period of the first entry into the dark compartment on the first day of training and after 24 hours with the introduction of P-11 before playing the skill (effect on the process of reproducing information about pain stimulation in rats) (M±m); \* – p<0.01 – data are reliable relative to the control. The number of animals in the group – 8

На модели нормобарической гипоксии было показано, что P-11 при однократном введении статистически недостоверно увеличивал продолжительность жизни крысят по сравнению с контролем (66,8±3,8 мин и 64,7±3,0 мин, соответственно). Время выживания на фоне введения P-11 было аналогично этому показателю в группах животных получавших фенотропил и пирацетам (66,1±2,97 мин и 68,6±4,51 мин, соответственно) (рисунок 3).

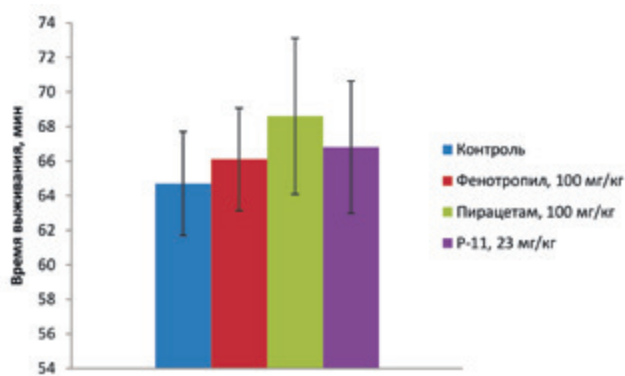


Рисунок 3. Влияние P-11 на время выживания крысят в условиях нормобарической гипоксии, (M±m). Количество животных в группе – 8

Figure 3. The effect of P-11 on the survival time of rats in the conditions of normobaric hypoxia, (M±m). The number of animals in the group – 8

В следующем эксперименте P-11 и препараты сравнения вводили в течение 14 дней до воспроизведения гипоксии. Продолжительность жизни в условиях гипоксии у контрольных животных была 22,54±0,72 мин. В группе P-11 время выживания мышей увеличилось до 26,0 мин (p<0,05, достоверно по сравнению с контролем) и было выше, чем при применении фенотропила (24,50±1,05 мин) и пирацетама (23,97±0,68 мин) (рисунок 4).

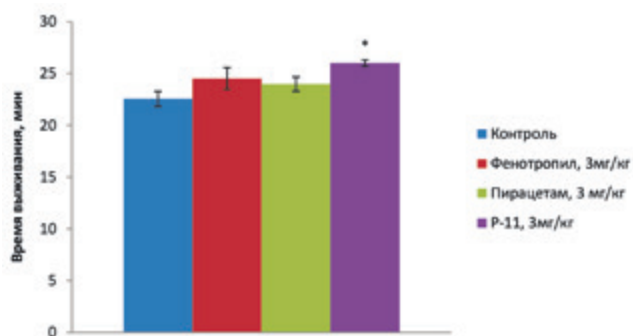


Рисунок 4. Влияние P-11 на время выживания мышей в условиях нормобарической гипоксии, (M±m); \* – p<0,05 – данные достоверны по отношению к контрольной группе. Количество животных в группе – 8

Figure 4. The effect of P-11 on the survival time of mice under conditions of normobaric hypoxia, (M±m); \* – p<0,05 – data are reliable with respect to the control group. The number of animals in the group – 8

Нормобарическая гипоксия с гиперкапнией сопровождалась нарастанием уровня МДА в тканях головного мозга экспериментальных животных по сравнению с интактными (27,8±0,9 и 9,4±0,8 нмоль/г, p<0,001, соответственно). Наибольшую активность проявил P-11, снизивший показатель липопероксидации в 1,5 раза (19,1±1,8 нмоль/г, p<0,001) относительно контроля. Препараты сравнения фенотропил и пирацетам понижа-

ли уровень МДА в 1,4 раза (19,4±1,6 нмоль/г p<0,001) и в 1,2 раза (23,4±1,4 нмоль/г, p<0,05) по сравнению с контролем (рисунок 5).

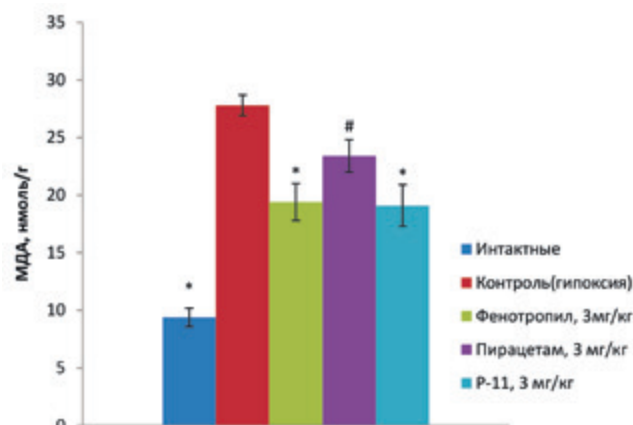


Рисунок 5. Влияние P-11 на уровень малонового диальдегида (МДА, нмоль/г) в головном мозге мышей в условиях нормобарической гипоксии, (M±m); \* – p<0,001; # – p<0,05 – данные достоверны по отношению к контролю с гипоксией. Количество животных в группе – 8

Figure 5. The effect of P-11 on the level of malondialdehyde (MDA, nmol/g) in the brain of mice under conditions of normobaric hypoxia, (M±m); \* – p<0,001; # – p<0,05 – data are reliable with respect to the control with hypoxia. The number of animals in the group – 8

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изучение ноотропной активности 3-аминопирролидин-2-она, соединенного с норборнанным фрагментом показало, что введение соединения на разных этапах выработки УРПИ улучшает способность животных к обучению и извлечению памятного следа о болевом раздражении через 24 часа после выработки рефлекса. Наиболее выраженные ноотропные свойства по сравнению с пирацетамом были отмечены у P-11 при его введении на этапе воспроизведения информации.

На модели нормобарической гипоксии при однократном введении P-11 проявил тенденцию к увеличению продолжительности жизни крысят относительно контроля, а при 14-дневном введении наблюдали выраженные антигипоксические свойства по сравнению с другими производными пирролидона – пирацетамом и фенотропилом, проявляющиеся в увеличении времени выживания мышей, а также в понижении процессов ПОЛ в ткани головного мозга.

Работа выполнена в рамках темы госзадания № АААА-А17-117011910032-4.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Вахитова Ю. В., Антипина Е. И., Ямиданов Р. С., Хисамутдинова Р.Ю. Идентификация генов-мишеней 5-аминоэкто-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-она на модели аритмии *in vivo*.



Биоорганическая химия. 2011; 6(37): 9–11. Doi.org/10.1134/S1068162011060148.

2. Миронов А. Н., Бунатян Н. Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – М.: Гриф и К, 2012; 944 с.
3. Современные методы в биохимии / Под. ред. акад. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина. 1977; С. 66–68.
4. Хисамутдинова Р. Ю., Сапожникова Т. А., Макара Н. ., Габдрахманова С. Ф., Зарудий Ф. С. Экспериментальное изучение антиаритмической активности и хронической токсичности 5-амино-эзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-она. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015; 2(11): 90–93.
5. Цыпышева И. П., Ковальская А. В., Макара Н. С., Лобов А. Н., Петренко И. А., Галкин Е. Г., Сапожникова Т. А., Зарудий Ф. С., Юнусов М. С. Синтез и специфическая ноотропная активность производных (-)-цитизина, имеющих в структуре фрагменты карбамидов и тиокарбамидов. *Химия природных соединений*. 2012; 4: 565. Doi.org/10.1007/s10600-012-0329-7.
6. Martino M. V., Guandalini L., Mannelli L. C. Di, Menicatti M., Bartolucci G., Dei S., Manetti D., Teodori E., Ghelardini C., Romanelli M. Piperazines as nootropic agents: New derivatives of the potent cognition-enhancer DM235 carrying hydrophilic substituents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2017; 25: 1795–1803. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.02.019.
7. Tsypysheva I. P., Koval'skaya A. V., Lobov A. N., Makara N. S., Petrova P. R., Farafontova E. I., Zainullina L. F., Vakhitova Yu. V., Zarudii F. S. Synthesis and nootropic activity of new 3-amino-12-n-methylcytisine derivatives. *Chemistry of Natural Compounds*. 2015; 5(51): 910–915. Doi.org/10.1007/s10600-015-1446-x.
8. Zveiniece L., Svalbe B., Veinberg G., Grinberga S., Vorona M., Kalvinsh I., Dambrova M. Investigation into stereoselective pharmacological activity of phenotropil. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2011; 109: 407–412. Doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00742.x.

## REFERENCES

1. Vakhitova Yu. V., Antipina E. I., Yamidjanov R. S., Khisamutdinova R. Yu. Identification of target genes 5-amino-exo-3-azatricyclo [5.2.1.0<sup>2,6</sup>] decan-4-one in vivo model of arrhythmia. *Bioorganic chemistry*. 2011; 6 (37): 9–11. Doi.org/10.1134/S1068162011060148 (In Russ.).
2. Mironov A. N. Bunatjan N. D. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. – М.: *Grief and K*, 2012; 944 p. (In Russ.).
3. Modern methods in biochemistry / Under. ed. Acad. V. N. Orekhovich. – М.: *Medicine*. 1977; Pp. 66–68 (In Russ.).
4. Khisamutdinova R. Yu., Sapozhnikova T. A., Makara N. S., Gabdrakhmanova S. F., Zarudii F. C. Experimental study of the antiarrhythmic activity and chronic toxicity of 5-amino-exo-3-azatricyclo [5.2.1.0<sup>2,6</sup>] decan-4-one. *Drugs development & registration*. 2015; 2 (11): 90–93 (In Russ.).
5. Tsypysheva I. P., Koval'skaya A. V., Makara N. S., Lobov A. N., Petrenko I. A., Galkin E. G., Sapozhnikova T. A., Zarudii F. C., Yunusov M. S. Synthesis and specific nootropic activity of derivatives (-)-cytisine, having in its structure fragments of carbamides and thiocarbamides. *Chemistry of natural compounds*. 2012; 4: 565. Doi.org/10.1007/s10600-012-0329-7. (In Russ.).
6. Martino M. V., Guandalini L., Mannelli L. C. Di, Menicatti M., Bartolucci G., Dei S., Manetti D., Teodori E., Ghelardini C., Romanelli M. Piperazines as nootropic agents: New derivatives of the potent cognition-enhancer DM235 carrying hydrophilic substituents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2017; 25: 1795–1803. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.02.019.
7. Tsypysheva I. P., Koval'skaya A. V., Lobov A. N., Makara N. S., Petrova P. R., Farafontova E. I., Zainullina L. F., Vakhitova Yu. V., Zarudii F. S. Synthesis and nootropic activity of new 3-amino-12-n-methylcytisine derivatives. *Chemistry of Natural Compounds*. 2015; 5(51): 910–915. Doi.org/10.1007/s10600-015-1446-x.
8. Zveiniece L., Svalbe B., Veinberg G., Grinberga S., Vorona M., Kalvinsh I., Dambrova M. Investigation into stereoselective pharmacological activity of phenotropil. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2011; 109: 407–412. Doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00742.x.

выставка IPhEB

# ЦИФРОВОЕ БУДУЩЕЕ ФАРМАЦЕВТИКИ



02-04 апреля 2019  
Санкт-Петербург

[gotoipheb.com](http://gotoipheb.com)

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-92-96  
УДК 616.98: 578.824.11

## РЕГИСТРАЦИОННАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ И ИЗМЕНЕНИЯ К НЕЙ КАК ЭЛЕМЕНТ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА (ОБЗОР)

О. А. Лобовикова<sup>1\*</sup>, И. В. Шульгина<sup>1</sup>, Е. Г. Абрамова<sup>1</sup>, А. К. Никифоров<sup>1,2</sup>, А. В. Комиссаров<sup>1,2</sup>,  
В. А. Демченко<sup>1</sup>, А. Г. Селезнева<sup>1</sup>, А. С. Феськова<sup>1</sup>, С. С. Галетова<sup>1</sup>, Н. П. Миронова<sup>1</sup>

1 – ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

2 – ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», 410012, Россия, г. Саратов, Театральная пл., д. 1

\*Контактное лицо: Лобовикова Оксана Анатольевна. E-mail: Lobovikova-o@yandex.ru. Тел.: 8 (8452) 51 54 46

Статья получена: 08.11.2018. Статья принята к печати: 13.12.2018

### Резюме

**Введение.** Документация является неотъемлемой частью системы управления качеством, ключевым элементом производства и контроля качества лекарственных средств. Необходимым условием Правил надлежащей производственной практики и гарантированного выпуска качественной продукции является соблюдение требований, изложенных в документах регистрационного досье на лекарственный препарат. В течение жизненного цикла лекарственного препарата может потребоваться внесение пострегистрационных изменений в досье.

**Текст.** Целью настоящей работы – аналитический обзор изменений документов регистрационного досье на лекарственный препарат «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий», раствор для инъекций, отражающих совершенствование биотехнологии производства лекарственного средства и методов его контроля в пострегистрационном периоде. Первые пострегистрационные изменения нормативной документации носили административный характер и не требовали проведения экспертизы образцов лекарственного средства. Следующая группа изменений документов регистрационного досье была обусловлена расширением масштабов производства, реконструкцией технологических участков и внедрением в производство инновационных технологий в целях приведения в соответствие требованиям GMP, а также улучшением потребительских свойств лекарственного препарата. Последняя группа изменений касалась пересмотра методов контроля качества готовой продукции, связанного с введением современного аналитического оборудования, расширения перечня стандартов и приведением в соответствие требованиям государственной фармакопеи XIII издания.

**Заключение.** Своевременное внесение изменений в документы регистрационного досье позволяет оптимизировать процедуру проведения внутреннего и внешнего контроля качества антирабического иммуноглобулина, а также избежать нарушений, связанных с актуализацией технологической документации.

**Ключевые слова:** регистрационное досье, фармакопейная статья предприятия, антирабический иммуноглобулин, биотехнология производства, методы контроля.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Лобовикова О. А., Шульгина И. В., Абрамова Е. Г., Никифоров А. К., Комиссаров А. В., Демченко В. А., Селезнева А. Г., Феськова А. С., Галетова С. С., Миронова Н. П. Регистрационная документация и изменения к ней как элемент системы менеджмента качества при производстве антирабического иммуноглобулина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 92–96.

## REGISTRATION DOCUMENTATION AND AMENDMENTS TO IT AS AN ELEMENT OF A QUALITY MANAGEMENT SYSTEM IN PRODUCTION OF ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULIN (REVIEW)

O. A. Lobovikova<sup>1\*</sup>, I. V. Shul'gina<sup>1</sup>, E. G. Abramova<sup>1</sup>, A. K. Nikiforov<sup>1,2</sup>, A. V. Komissarov<sup>1,2</sup>,  
V. A. Demchenko<sup>1</sup>, A. G. Selezneva<sup>1</sup>, A. S. Fes'kova<sup>1</sup>, S. S. Galetova<sup>1</sup>, N. P. Mironova<sup>1</sup>

1 – Federal State health agency «Russian State anti-plague Research Institute «Microbe» the Federal service for Surveillance on consumers rights protection and human wellbeing, 46, University str., Saratov, 410005, Russia

2 – Saratov State Agrarian University named after Vavilova, 1, Teatralnaya sq., Saratov, 410012, Russia

\*Corresponding author: Oksana A. Lobovikova. E-mail: Lobovikova-o@yandex.ru. Tel.: 8 (8452) 51 54 46

Received: 08.11.2018. Accepted: 13.12.2018

### Abstract

**Introduction.** Documentation is an integral part of the quality management system, a key element of production and quality control of medicines. A necessary condition for the Rules of good manufacturing practice and guaranteed production of quality products is compliance with the requirements set out in the documents of the registration dossier for the drug. During the life cycle of a drug, post-registration changes in the dossier may be required.

**Text.** This work is an analytical review of changes in the documents of the registration dossier for the drug «Immunoglobulin antirabic from horse blood serum liquid», solution for injections, reflecting the improvement of biotechnology of drug production and methods of its control in the post – registration period. The first post-registration changes in the regulatory documentation were administrative in nature and did not require examination of samples of the drug. The next group of changes in the documents of the registration dossier was due to the expansion of production, reconstruction of technological sites and the introduction of innovative technologies in order to comply with the requirements of GMP, as well as improving the consumer properties of the drug. The last group of changes concerned the revision of methods of quality control of finished products associated with the introduction of modern analytical equipment, expanding the list of standards and bringing into compliance with the requirements of the state Pharmacopoeia XIII edition.

**Conclusion.** The timely introduction of changes into documents of the registration dossier allows you to optimize the procedure for the conduct of internal and external control of rabies immunoglobulin, as well as to avoid violations related to the actualization of the technological documentation. The analysis of changes in the documents of the registration dossier for the drug «Immunoglobulin antirabic from horse blood serum liquid», solution for injections, reflecting the improvement of biotechnology of drug production and methods of its control in the post-registration period. Timely changes in the documents of the registration dossier allow to optimize the procedure of internal and external quality control of anti-rabies immunoglobulin, as well as to avoid violations associated with the updating of technological documentation.

**Keywords:** registration dossier, pharmacopoeia article of the enterprise, anti-rabies immunoglobulin, production biotechnology, control methods.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Lobovikova O. A., Shul'gina I. V., Abramova E. G., Nikiforov A. K., Komissarov A. V., Demchenko V. A., Selezneva A. G., Fes'kova A. S., Galetova S. S., Mironova N. P. Registration documentation and amendments to it as an element of a quality management system in production of anti-rabies immunoglobulin. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 92–96.



## ВВЕДЕНИЕ

Система менеджмента качества (СМК) производства лекарственных средств представляет собой совокупность организационных мер, направленных на обеспечение соответствия качества лекарственных средств их назначению. Документация является неотъемлемой частью системы управления качеством, ключевым элементом производства и контроля качества лекарственных средств. Основная цель документации – управление, контроль и регистрация деятельности, которая непосредственно или опосредованно влияет на все аспекты качества лекарственных средств.

Необходимым условием Правил надлежащей производственной практики и гарантированного выпуска качественной продукции является соблюдение требований, изложенных в документах регистрационного досье на лекарственный препарат [1]. Основными документами регистрационного досье являются фармакопейная статья предприятия (ФСП), содержащая перечень показателей и методов контроля качества лекарственного средства; инструкция по применению; макеты маркировки первичной и потребительской упаковок, определяющие их дизайн и цветовое исполнение. Анализ результатов GMP-инспектирования отечественных и зарубежных производителей лекарственных средств показал, что несоответствие требованиям регистрационного досье является наиболее значимым в числе выявленных критических несоответствий [2, 3].

В течение жизненного цикла лекарственного препарата (ЛП) может потребоваться внесение пострегистрационных изменений в досье. Такая необходимость бывает обусловлена различными причинами, чаще всего связанными с модернизацией технологии производства и контроля качества, изменением формы выпуска или состава, появлением новых сведений о клинической эффективности и безопасности применения лекарственного средства, а также рядом факторов 1,8

административно-правового характера.

В Российской Федерации внесение изменений в регистрационное досье регламентируется статьей 30 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 13 декабря 2016 года № 959н «Классификация изменений, вносимых в документы, содержащиеся в регистрационном досье на зарегистрированный лекарственный препарат для медицинского применения» [4, 5]. Согласно предложенной классификации все изменения могут быть разделены на две категории: I – изменения, не требующие проведения экспертизы предложенных методов контроля качества лекарственного средства и качества представленных образцов лекарственного средства с использованием

этих методов и (или) экспертизы отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения лекарственного препарата (11 наименований), II – изменения, требующие проведения указанной экспертизы (42 наименования).

Целью настоящей работы является анализ изменений документов регистрационного досье, отражающих совершенствование биотехнологии производства антирабического иммуноглобулина и методов его контроля.

## ИСТОРИЯ РОССИЙСКОГО ПРОИЗВОДСТВА АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

К концу прошлого века Российская Федерация не имела собственного производства иммунобиологических лекарственных препаратов для пассивной профилактики бешенства, так как единственным предприятием на постсоветском пространстве, выпускающим гетерологичный антирабический иммуноглобулин, осталось ЗАО «Харьковское предприятие по производству иммунобиологических и лекарственных препаратов «Биолек», Украина. Кроме того, в середине 90-х годов из-за ухудшения эпизоотолого-эпидемиологической обстановки по бешенству произошло резкое увеличение числа лиц, обратившихся за антирабической помощью, которое достигло 400 тыс. и более человек в год [6, 7].

В соответствии с поручением главного санитарного врача Российской Федерации Г. Г. Онищенко за № 2510/12020-99-26 от 19.11.1999 г. и решением межведомственной комиссии Совета безопасности РФ по охране здоровья населения № 1 от 24.10.2000 г. в РосНИИПЧИ «Микроб» (РосНИПЧИ «Микроб») были начаты работы по организации производства антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади.

Первые экспериментально-производственные серии антирабического иммуноглобулина были получены по воспроизведенной технологии, разработанной в середине XX века в Томском научно-исследовательском институте вакцин и сывороток [8, 9], которая включала в себя стадии получения органо-тканевого антигена для иммунизации лошадей-продуцентов, гипериммунизацию продуцентов, получение иммунной сыворотки, фракционирование гамма-глобулиновой фракции методом риванол-спиртового осаждения и получение готовой лекарственной формы – раствора для инъекций.

## РЕГИСТРАЦИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНА АНТИРАБИЧЕСКОГО

В 2003 г. ЛП «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий», раствор для инъекций производства РосНИПЧИ «Микроб» был заре-

гистрирован в Российской Федерации, получено регистрационное удостоверение (РУ) Р № 002639/01-2003 от 30.06.2003 г. сроком действия 5 лет.

Разработанная в 2003 г. и утвержденная Минздравом Российской Федерации нормативная документация ФСП 42-0020-4413-03 предусматривала выпускающий контроль качества антирабического иммуноглобулина по 15 показателям: описание; подлинность (видоспецифичность, специфичность антител); прозрачность; цветность; видимые механические включения; pH; герметизация; содержание белка; тесты на чистоту – электрофоретическая однородность, содержание риванола и спирта этилового; стерильность; пирогенность; токсичность; специфическая активность. Кроме того, ФСП были предусмотрены тесты контроля иммуноглобулина, разведенного 1:100, выпускаемого в комплекте с препаратом: описание, pH, прозрачность, цветность, белок, стерильность, а также регламентированы требования к упаковке и маркировке препарата.

## ПОСТРЕГИСТРАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ РЕГИСТРАЦИОННОГО ДОСЬЕ

В 2008 году в связи с окончанием срока действия РУ была начата процедура перерегистрации лекарственного средства «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий», раствор для инъекций, в ходе которой была оформлена и утверждена Минздравом Российской Федерации новая ФСП Р N002639/01-250210 и получено РУ от 25.02.2010 г. без ограничения срока действия.

Первые пострегистрационные изменения, которые коснулись действующей нормативной документации на антирабический иммуноглобулин, относились к изменениям административного характера и не требовали проведения экспертизы предложенных методов контроля качества и образцов лекарственного средства.

В 2011 году с целью приведения маркировки первичной и вторичной упаковки лекарственных средств в соответствие с ФЗ-61 «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 г., статьей 46 «Маркировка лекарственных средств» было подготовлено изменение № 1 Р N002639/01-121011, корректирующее текст маркировок.

В 2013 году было утверждено Изменение № 2 ФСП Р N002639/01-190613, связанное с изменением организационно-правовой формы держателя РУ. На основании 83-ФЗ от 08.05.2010 [10] организация-производитель (РосНИПЧИ «Микроб») была переведена из Федеральных государственных учреждений здравоохранения в казенные, что нашло отражение во всех учредительных документах учреждения, а затем с целью правильной идентификации производителя – в документах регистрационного досье лекарственного препарата. В ФСП на «Иммуноглобулин антираби-

ческий из сыворотки крови лошади жидкий», раствор для инъекций изменения были внесены в титульный лист, в пункты «Производитель», «Фасовщик», «Упаковщик», «Выпускающий контроль качества» и «Заявитель». Помимо ФСП, изменения названия производителя были внесены в макеты первичной и вторичной упаковок, РУ лекарственного препарата для медицинского применения и инструкцию по применению.

Изменения технологии производства и аналитических методов контроля, используемых при осуществлении контроля качества лекарственных средств, однозначно трактуются как изменения, требующие проведения экспертизы предложенных методов контроля качества, качества представленных образцов лекарственного средства с использованием этих методов и (или) экспертизы отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения.

За 15 лет серийного выпуска антирабического иммуноглобулина биотехнология производства и методы контроля качества препарата претерпели значительные изменения, которые были обусловлены расширением масштабов производства, реконструкцией технологических участков и внедрением в производство инновационных технологий в целях приведения в соответствие требованиям GMP. Так, осуществлена модернизация технологической линии приготовления лекарственной формы (раствора для инъекций): в 2013 году введен в эксплуатацию комплекс «чистых помещений» для осуществления операций мойки, стерилизации, стерильного наполнения и герметизации ампул, оснащенный современным оборудованием («BAUSCH+STROEBLE», Германия). Изменение № 3 ФСП Р N002639/01-240215, касающееся разделов «Механические включения», «Герметизация» закрепило внедрение автоматических способов контроля механических включений и герметизации ампул с препаратом.

Модернизация аппаратной схемы производства коснулась и этапа маркировки первичной упаковки – ручной процесс маркировки был заменен автоматическим с использованием машины этикетировочной («ALPHACOS-SA sa», Швейцария), что нашло отражение в документах регистрационного досье: изменение № 1 ФСП Р N002639/01-121011, раздел «Упаковка» узаконило нанесение этикеток на ампулы с помощью этикетировочной машины.

Следующее направление совершенствования качества при производстве антирабического иммуноглобулина связано с улучшением потребительских свойств лекарственного препарата, а именно его упаковки. Современная упаковка должна соответствовать ряду обязательных требований: быть удобной и безопасной, обеспечивать сохранность лекарственного средства, содержать необходимые сведения о нем [11]. Изменением № 3 Р ФСП N002639/01-240215 раздела «Спецификация. Упаковка» предусмотрена возможность использования в качестве первичной упаковки

ампул с системой вскрытия, что гарантирует легкость, быстроту и безопасность применения потребителем и минимизирует риски производственного травматизма среди медперсонала. Кроме того, вскрытие ампулы по переломному кольцу без скарификатора способствует сохранению чистоты раствора от стеклянной пыли. В настоящее время для обеспечения целостности ампул при транспортировании антирабического иммуноглобулина предусмотрено использование соединенных между собой контурных ячейковых упаковок без покрытия, помещенных в картонную пачку, в качестве дополнительной вторичной упаковки, что соответствует изменению № 4 Р ФСП N002639/01-090216 раздела «Спецификация. Упаковка». Кроме этого, новая редакция данного раздела ФСП предусматривала исключение фасовки иммуноглобулина по 10 мл в ампуле как несоответствующей рекомендуемым дозировкам для разных возрастных групп и весовых категорий пациентов. Последнее изменение в ФСП повлекло замену РУ и внесение изменений в инструкцию по применению.

Последняя группа изменений ФСП касается пересмотра методов контроля качества готовой продукции, связанного с введением современного аналитического оборудования, расширения перечня стандартов, а также приведением нормативной документации на лекарственное средство в соответствие требованиям государственной фармакопеи XIII издания [12].

Изменение ФСП № 3 Р N002639/01-240215 регламентировало введение современной методики контроля остаточного спирта этилового с помощью газовой хроматографии (ГФ XII, вып.1, с. 49, ОФС 42-0039-07) взамен метода перегонки [13, 14].

Помимо внедрения новой методики определения остаточного спирта, изменение ФСП № 3 Р N002639/01-240215 затронуло раздел «Описание», согласно которому в растворе иммуноглобулина допускается появление в процессе хранения при температуре от 2 до 8 °C незначительного осадка, исчезающего при встряхивании. Данный факт связан с физическими особенностями коллоидных растворов белков высокой концентрации (до 11%), каким является раствор антирабического иммуноглобулина. Кроме того, перед введением иммуноглобулин антирабический подогревают до  $37 \pm 0,5$  °C, что приводит к полному растворению осадка. Таким образом, образование незначительного осадка в процессе хранения иммуноглобулинового препарата не оказывает отрицательного влияния на показатели качества ЛП.

Наиболее существенные изменения коснулись раздела «Специфическая активность» (изменение ФСП № 4 Р N002639/01-090216). Контроль специфической активности иммуноглобулина антирабического методом биологической нейтрализации вируса бешенства на белых мышах осуществляется с использованием стандартного образца (СО) специфической активности иммуноглобулина. Отсутствие в настоящее время в

Российской Федерации отраслевого (фармакопейного) СО повлекло за собой проведение контроля качества готовой продукции и испытаний в целях подтверждения соответствия с применением международного стандартного образца ВОЗ иммуноглобулина человеческого против бешенства, который является труднодоступным и дорогостоящим референтным материалом. В связи с этим производителем был разработан и аттестован против указанного международного стандарта стандартный образец предприятия (СОП) специфической активности антирабического иммуноглобулина [15]. Представленные в Экспертную организацию отчет о разработке СОП, включающий сведения о его получении, определении метрологических характеристик и исследовании стабильности при хранении, а также материалы по валидации аналитической методики с использованием разработанного СОП послужили основанием для принятия положительного решения Минздрава РФ об утверждении изменений ФСП № 4. Кроме того, для приведения ФСП в соответствие требованиям ФС.3.3.1.0038.15 и получения более достоверных результатов исследования специфической активности в текст новой редакции раздела «Специфическая активность» была внесена информация об увеличении числа лабораторных животных, используемых при постановке контрольных тестов *in vivo*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Производство лекарственных препаратов, отвечающих требованиям регистрационного досье, является одним из основных принципов GMP и гарантирует выпуск безопасной и эффективной продукции установленного качества. Федеральный закон N 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» определяет качество лекарственного средства как соответствие лекарственного средства требованиям фармакопейной статьи.

В связи с этим, все изменения, направленные на совершенствование биотехнологии производства антирабического иммуноглобулина и методов его контроля, были своевременно отражены в документах регистрационного досье. Изменения регистрационной документации, согласованные и утвержденные в установленном порядке, позволяют избежать нарушений, связанных с актуализацией производственной документации внутреннего уровня (промышленный регламент, стандартные операционные процедуры и производственное досье на серию лекарственного средства) с указанием новых технологических процессов, а также оптимизировать процедуры проведения контроля качества на этапах жизненного цикла лекарственного препарата: выпускающего контроля на производстве, подтверждения соответствия в виде обязательной сертификации в органах сертификации и испытательных лабораториях, а также выборочного



контроля при обращении лекарственных средств. Оптимизация процедур контроля позволяет минимизировать путь от производителя к конечному потребителю, что особенно актуально в настоящее время ввиду повышенного спроса на препарат для пассивной профилактики бешенства «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий», раствор для инъекций из-за неблагоприятной эпизоотической и эпидемиологической ситуации по бешенству в Российской Федерации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Минпромторга Российской Федерации от 14 июля 2013 г. № 916 «Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств».
2. Мурашко М. А. Актуальные вопросы обеспечения качества лекарственных средств и медицинских изделий в современных условиях. *Фармацевтические технологии и упаковка*. 2014; 5: 80–86.
3. Орлов В. А. Анализ ключевых тенденций по результатам инспектирования зарубежных производителей лекарственных средств за 2016 год. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 2(19): 266–271.
4. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 13 декабря 2016 года № 959н «Классификация изменений, вносимых в документы, содержащиеся в регистрационном досье на зарегистрированный лекарственный препарат для медицинского применения».
5. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», с изменениями и дополнениями от: 27 июля, 11 октября, 29 ноября 2010 г., 6 декабря 2011 г., 25 июня, 25 декабря 2012 г., 2 июля, 25 ноября 2013 г., 12 марта, 22 октября, 22 декабря 2014 г., 8 марта, 29 июня, 13 июля, 14, 29 декабря 2015 г., 2 июня, 3 июля 2016 г., 29 июля, 28 декабря 2017 г., 4 июня 2018 г.
6. Абрамова Е. Г., Никифоров А. К., Лобовикова О. А. и др. Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина – итоги первых пяти лет. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010; 3(105): 58–62.
7. Онищенко Г. Г., Попова А. Ю., Ежлова Е. Б. и др. Эпидемиологическая обстановка и вопросы идентификации вируса бешенства среди людей на территории Российской Федерации в период 2002–2015 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 3: 27–32. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-27-32.
8. Карпов С. Н., Прегер С. М., Синельников С. П., Федорова Ю. В. Гипериммунные сыворотки. Томск, 1976; 380.
9. Селимов М. А. Бешенство. М.: Медицина, 1978. 336 с.
10. Федеральный закон от 8 мая 2010 г. № 83-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации в связи с совершенствованием правового положения государственных (муниципальных) учреждений», с изменениями и дополнениями от: 27 июля, 8, 29 ноября 2010 г., 7 февраля, 18 июля, 6 декабря 2011 г., 29 декабря 2012 г., 5 апреля, 7 мая, 28 декабря 2013 г., 5 мая, 4 октября, 31 декабря 2014 г., 3 ноября, 29 декабря 2015 г., 30 ноября 2016 г., 27 ноября 2017 г.
11. Прякина Е. А. Упаковка лекарственных препаратов: актуальные вопросы экспертизы. *Новости GMP*. 2018; 2(16): 106–111.
12. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. / МЗ РФ. М., 2015; 1470.
13. Генералов С. В., Киреев М. Н., Абрамова Е. Г., Лобовикова О. А. Оптимизация метода газовой хроматографии для контроля остаточного этанола в препарате гетерологичного антирабического иммуноглобулина. *Acta Biomedica Scientifica*. 2012; 5-1(87): 197–200.
14. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XII изд. Ч. 1. МЗ РФ. М., 2008; 704.
15. Абрамова Е. Г., Лобовикова О. А., Шульгина И. В. и др. Разработка стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 4(21): 160–164.

## REFERENCES

1. Order of the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation dated July 14, 2013. № 916 «Rules for organizing the production and quality control of medicines» (In Russ.).
2. Murashko M. A. Current issues of ensuring the quality of medicines and medical devices in modern conditions. *Pharmaceutical technology and packaging*. 2014; 5: 80–86 (In Russ.).
3. Orlov V. A. Analysis of key trends in the results of inspections of foreign manufacturers of medicines for 2016. *Drug development & registration*. 2017; 2(19): 266–271 (In Russ.).
4. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of December 13, 2016 № 959n «Classification of changes made to documents contained in the registration dossier for a registered drug for medical use» (In Russ.).
5. Federal Law of 12 April 2010 № 61-ФЗ «On Circulation of Medicinal Products», with amendments and additions dated July 27, October 11, November 29, 2010, December 6, 2011, June 25, December 25, 2012, July 2, November 25, 2013, March 12, October 22, December 22, 2014, March 8, June 29, July 13, December 14, December 2015, June 2, July 3, 2016, 29 July 28, 2017, June 4, 2018 (In Russ.).
6. Abramova E. G., Nikiforov A. K., Lobovikova O. A. et al. Production of heterologous rabies immunoglobulin – results of the first five years. *Problems of especially dangerous infections*. 2010; 3(105): 58–62. (In Russ.).
7. Onishchenko G. G., Popova A. Yu., Ezhlova E. B. et al. Epidemiological situation and issues of identification of the rabies virus among people in the territory of the Russian Federation in the period 2002–2015. *Problems of especially dangerous infections*. 2017; 3: 27–32 (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-27-32.
8. Karpov S. N., Preger S. M., Sinel'nikov S. P., Fedorova Yu. V. Hyperimmune sera. Tomsk, 1976; 380 (In Russ.).
9. Selimov M. A. Rabies. M.: Medicine, 1978; 336 (In Russ.).
10. Federal Law of May 8, 2010 № 83-ФЗ «On Amendments to Certain Legislative Acts of the Russian Federation in Connection with Improving the Legal Position of State (Municipal) Institutions», with amendments and additions dated July 27, November 8, 2010, February 7, July 18, December 6, 2011, December 29, 2012, April 5, May 7, December 28, 2013, May 5, October 4, December 31, 2014, November 3, December 29, 2015 November 30, 2016, November 27, 2017 (In Russ.).
11. Pryahina E. A. Packaging of drugs: current issues of expertise // *GMP news*. 2018; 2(16): 106–111 (In Russ.).
12. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII ed. V. 1. MZ RF. M., 2015; 1470. (In Russ.).
13. Generalov S. V., Kireev M. N., Abramova E. G., Lobovikova O. A. Optimization of gas chromatography to control residual ethanol in the preparation of heterologous rabies immunoglobulin. *Acta Biomedica Scientifica*. 2012; 5-1(87): 197–200 (In Russ.).
14. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XII edition. Part 1. MZ RF. M., 2008; 704 (In Russ.).
15. Abramova E. G., Lobovikova O. A., Shul'gina I. V. et al. Development of a standard sample of an enterprise (SOP) of a specific anti-rabies immunoglobulin activity from horse serum. *Drug development & registration*. 2017; 4(21): 160–164 (In Russ.).

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-97-101  
УДК 615.21

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИБУТРАМИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И БАД К ПИЩЕ АНОРЕКСИГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ (ОБЗОР)

А. М. Суханова<sup>1\*</sup>, И. Б. Перова<sup>2</sup>, Г. М. Родионова<sup>1</sup>, К. И. Эллер<sup>2</sup>, В. И. Гегечкори<sup>1</sup><sup>1</sup> – ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8<sup>2</sup> – ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», 109240, Россия, г. Москва, Устьинский пр-д, 2/14

\*Контактное лицо: Суханова Анна. E-mail: annamsukhanova@gmail.com

Статья получена: 21.11.2018. Статья принята к печати: 19.12.2018

### Резюме

**Введение.** На сегодняшний день наиболее эффективным из существующих на фармацевтическом рынке анорексигенных препаратов является сибутрамин. По химической структуре сибутрамин имеет сходство с амфетамином. Активные метаболиты сибутрамина, образованные в процессе его метаболизма, обладают наибольшей фармакологической активностью по сравнению с исходным веществом, поэтому препарат может быть токсичным для организма человека. Сибутрамин применяют при комплексном лечении ожирения, при корректровке лишней массы тела при сахарном диабете II типа, а также применяют при синдроме поликистозных яичников. Препарат обладает множеством серьезных нежелательных побочных эффектов, таких как повышение систолического и/или диастолического давления и частоты сердечных сокращений; головные боли, бессонница, расстройства желудочно-кишечного тракта и может вызвать летальный исход. В связи с наличием широкого спектра серьезных побочных эффектов сибутрамин был запрещен во многих странах мира.

**Текст.** Цель статьи – описание лекарственного препарата сибутрамина, его статус на фармацевтическом рынке Российской Федерации и других странах мира, обзор возможных методов определения сибутрамина в БАД к пище.

**Заключение.** В последнее время все чаще появляется информация о недекларируемом добавлении сибутрамина в состав анорексигенных БАД (биологически активная добавка) к пище для повышения их эффективности. Поэтому необходимо разработать методики определения сибутрамина в БАД к пище анорексигенного действия. В связи с этим проведен анализ методов, применяемых для идентификации и количественного определения сибутрамина. Как правило, спектральные методы используются для определения подлинности субстанции сибутрамина. Наиболее распространенным и эффективным методом определения подлинности, так и количественного анализа сибутрамина, является метод ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) с использованием масс-спектрометрического и диоднолучного детекторами (ДМД). На данный момент разрабатывается методика определения сибутрамина в составе лекарственных препаратов и БАД к пище анорексигенного действия, что внесет вклад в развитие фармации.

**Ключевые слова:** сибутрамин, лекарственные препараты анорексигенного действия, БАД к пище, фальсификация, методы.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Суханова А. М., Перова И. Б., Родионова Г. М., Эллер К. И., Гегечкори В. И. Использование сибутрамина в лекарственных препаратах и БАД к пище анорексигенного действия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 97–101.

## USE OF SIBUTRAMIN IN PHARMACEUTICAL DRUGS AND ANOREXIC DIETARY SUPPLEMENTS (REVIEW)

А. М. Sukhanova<sup>1</sup>, I. B. Perova<sup>2</sup>, G. M. Rodionova<sup>1</sup>, K. I. Eller<sup>2</sup>, V. I. Gegechkori<sup>1</sup><sup>1</sup> – I. M. Sechenov First MSU MOH Russia (Sechenovskij University), 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia<sup>2</sup> – Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 2/14, Ustyinsky passage, Moscow, 109240, Russia

\*Corresponding author: Anna M. Sukhanova. E-mail: annamsukhanova@gmail.com

Received: 21.11.2018. Accepted: 19.12.2018

### Abstract

**Background.** The most effective anorexic drugs on the pharmaceutical market are sibutramine. According to the standard scheme, sibutramine is similar to amphetamine. The active metabolites of sibutramine, formed in the process of its metabolism, have high pharmacological activity compared with the original substances, so the drug may be toxic to the body. Sibutramine is used in the complex treatment of obesity, when adjusting excess body weight in type II diabetes, and also used in polycystic ovary syndrome. The drug has many serious undesirable side effects, such as an increase in systolic and / or diastolic pressure and heart rate; headaches, insomnia, disorders of the gastrointestinal tract and can cause death. In many countries of the world a wide range of serious side effects has been banned.

**Text.** A description of the drug sibutramine, its status on the pharmaceutical market of the Russian Federation and other countries of the world, an overview of possible methods for determining sibutramine in food supplements.

**Conclusion.** Recently, information about the undeclared addition of sibutramine to the anorexigenic dietary supplement (dietary supplement) to increase their effectiveness has increasingly appeared. Therefore, it is necessary to develop methods for determining sibutramine in anorexic dietary supplements. In this regard, an analysis of the methods used for the quantitative determination of sibutramine. As a rule, spectral methods are used to determine the authenticity of a sibutramine substance. The most common and effective method for determining authenticity and quantitative analysis of sibutramine is the HPLC (high performance liquid chromatography) method using mass spectrometric and diode array detectors (DAD). At the moment, a method for determining sibutramine in the composition of multicomponent drugs and dietary supplements to food of anorexigenic action is being developed, which will contribute to the development of pharmacy.

**Keywords:** sibutramine, anorexic drugs, dietary supplements, adulteration, methods.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Sukhanova A. M., Perova I. B., Rodionova G. M., Eller K. I., Gegechkori V. I. Use of sibutramin in pharmaceutical drugs and anorexic dietary supplements. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 97–101.

## ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день сибутрамин является высокоэффективным анорексигенным лекарственным препаратом, который применяется при различных заболеваниях, в частности, при лечении ожирения.

По химическому строению сибутрамин – (±)-1-(4-хлорфенил)-N,N-диметил-α-(2-метилпропил)циклобутанметанамин (в виде гидрохлорида), имеет структурное сходство с амфетамином (рисунок 1). Это кристаллический порошок от белого до

кремового цвета. Растворимость в воде: 2,9 мг/мл при pH 5,2. Коэффициент распределения (октанол/вода): 30,9 (pH 5,0). Молярная масса сибутрамина составляет 279,85 г/моль, сибутрамина гидрохлорида моногидрата – 334,33 г/моль.

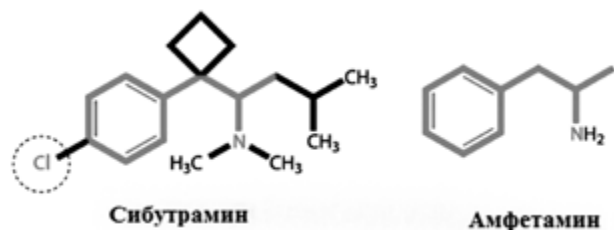


Рисунок 1. Сибутрамин и амфетамин

Figure 1. Sibutramine and amphetamine

## СИБУТРАМИН КАК ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

В 1995 году было отмечено, что среди других его фармакологических эффектов преобладает значительное снижение веса. В связи с этим в 1997 году Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов (FDA) одобрило его как препарат при комплексном лечении ожирения.

В лекарственных препаратах сибутрамин выпускается в виде капсул как однокомпонентный препарат: Меридиа® (Эбботт ГмбХ, Германия), Голдлайн® (Ranbaxy, Индия), Слимия® (Torrent, Индия), «Линдакса» (Zentiva, Чехия), а также в составе многокомпонентных лекарственных средств: «Редуксин» (ООО «Озон», Россия), Голдлайн® плюс, (ООО «Изварино Фарма», Россия) в дозировке 10 и 15 мг.

Впервые сибутрамин был синтезирован и исследован Abbott Laboratories в 1987 году в качестве антидепрессанта. В силу наблюдаемых фармакологических эффектов на сегодняшний день сибутрамин относится к препаратам для похудения. Согласно существующей классификации препаратов, понижающих аппетит, сибутрамин относится к анорексигенным средствам, стимулирующим ЦНС [1, 2].

Механизм действия препарата связан с ингибированием обратного нейронального захвата норадреналина, серотонина и дофамина. Вследствие чего снижается масса тела в связи с подавлением аппетита на уровне ЦНС [3, 4]. Также в сыворотке крови понижается концентрация мочевой кислоты, липидов, общего холестерина, ЛПНП, ЛПВП, увеличивается термогенез [2].

Сибутрамин применяют не только при лечении алиментарного ожирения, но и при коррективке избыточной массы тела, обусловленной дислипотеинемией или сахарным диабетом II типа. Также выяв-

лено влияние препарата на репродуктивную функцию при синдроме поликистозных яичников. [5–7].

Наряду с высокой эффективностью сибутрамин обладает множеством нежелательных побочных эффектов: повышение систолического и/или диастолического давления и частоты сердечных сокращений; головные боли, сухость во рту, бессонница, расстройства желудочно-кишечного тракта, угнетение активности симпатической нервной системы, а также возможно появление судорог и острого психоза, которые могут привести к летальному исходу [8, 9]. Также сибутрамин может вызывать явление тахифилаксии, при длительном приеме его эффективность снижается, то есть возникает устойчивость к дальнейшему приему лекарственного средства [8].

В настоящее время отпуск и применение сибутрамина ограничены во многих странах мира. В Российской Федерации препарат входит в Перечень сильнодействующих и ядовитых веществ, незаконное распространение которых попадает под действие статьи 234 УК РФ (незаконный оборот сильнодействующих или ядовитых веществ в целях сбыта) [10, 11].

В силу того, что сибутрамин обладает серьезными побочными эффектами, препарат был включен с 2006 года в запрещенный список Всемирного антидопингового агентства (WADA) и отнесен к субстанциям, запрещенным во время соревнований, то есть относится к категории «особых субстанций», разделу S6 – стимуляторы [12, 13].

Следует обращать внимание на отсутствие сибутрамина в спортивном питании, чтобы уменьшить частоту возникновения случаев допинговых скандалов у российских спортсменов.

В организме сибутрамин подвергается метаболизму с образованием активных метаболитов М1 – десметилсибутрамин и М2 – дидесметилсибутрамин (рисунок 2). Они обладают еще большей активностью захвата нейромедиаторов и более длительным временем полувыведения.  $T_{1/2}$  сибутрамина – 1,1 ч, десметилсибутрамина – 14 ч, дидесметилсибутрамина – 16 ч [9]. При такой системе метаболизма ферменты печени находятся в недостатке, чтобы провести дальнейшую конъюгацию, поэтому метаболиты сибутрамина представляются токсичными, что может способствовать возникновению острых отравлений, летальному исходу.

В соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации (РФ) от 29 декабря 2007 г. № 964 г. Москва «Об утверждении списков сильнодействующих и ядовитых веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Российской Федерации, а также крупного размера сильнодействующих веществ для целей статьи 234 Уголовного кодекса Российской Федерации» сибутрамин, а также его структурные аналоги, обладающие схожим психоактивным действием, относятся к данному списку.



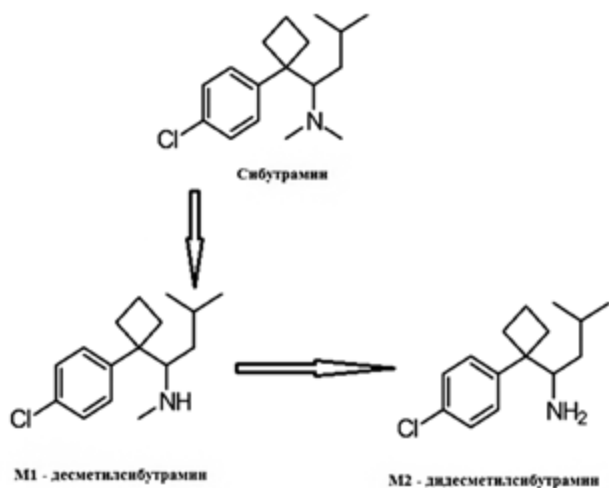


Рисунок 2. Метаболиты сибутрамина

Figure 2. Sibutramine Metabolites

В 2010 году в США FDA отозвало сибутрамин с фармацевтического рынка, основываясь на данных проведенного исследования SCOUT (Sibutramine Cardiovascular Morbidity/Mortality Outcomes Study in Overweight or Obese Subjects at Risk of a Cardiovascular Event), которое выявило связь между снижением массы тела при долгосрочном лечении ожирения сибутрамином и тяжелыми осложнениями со стороны сердечно-сосудистой системы: стенокардией, инсультом, инфарктом миокарда [14].

В Китае производство и продажа сибутрамина запрещены, в Индии, Новой Зеландии и во всех странах *Европейского Союза* под запретом только продажа.

## СИБУТРАМИН В СОСТАВЕ БАД К ПИЩЕ

В этой связи приобретает особую актуальность его недекларируемое применение в составе анорексигенных БАД к пище, которые отпускаются без рецепта и содержат комплекс растительных компонентов, предположительно способствующих похудению. При этом в ряде случаев эффективность подобных БАД к пище связано в основном с недекларируемым добавлением в них субстанции сибутрамина [15–17].

Основными растительными компонентами БАД к пище с заявленным анорексигенным действием являются экстракты папайи, айвы, лимона, спирулины, порошок экстракт зеленого чая, экстракт боярышника, цветки хризантемы, листья периллы, семена кассии тора, цветки эльшотии ресничатой, люцерна, гриб пория кокосовидная, орехи колы, семена гуараны, вытяжка плодов камбоджийской гарцинии, пажитник.

На территории Российской Федерации действует технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011). БАД

к пище должны отвечать установленным требованиям нормативной документации.

В странах Евросоюза основным документом, регламентирующим продажу БАД, является Директива Европейского парламента 2002/46/ЕС от 10 июня 2002 г. «О единых законах о биологически активных добавках в странах-участниках ЕС» (2002 г.): «Биологически активные добавки – это пищевые продукты, назначением которых является дополнение нормального рациона питания и которые представляют собой концентрированные источники питательных веществ и других субстанций с питательным или физиологическим действием, отдельно или в сочетаниях» [18].

Разработанные в РФ методики качественного и количественного определения сибутрамина до настоящего времени не получили статус методики выполнения измерений (МВИ) и/или не утверждены, например, в качестве методических указаний (МУК) Роспотребнадзора [19, 20].

Подлинность субстанции сибутрамина оценивают спектральными методами: УФ – спектрофотометрией и ИК – спектрометрией [21]. Для количественного определения сибутрамина в субстанции, капсулах, биожидкостях, БАД к пище используют методики с предварительным разделением – обращенно – фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ОФ ВЭЖХ) с диодноматричным детектором, а также масс – спектрометрическими детекторами высокого и/или низкого разрешения. В связи с высокой полярностью и низкой летучестью сибутрамина реже применяется метод газовой хроматографии с пламенно-ионизационным и масс – селективными детекторами [20, 22–25].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сибутрамин является высокоэффективным анорексигенным лекарственным препаратом, но обладает различными серьезными побочными эффектами. Сибутрамин относится к рецептурным препаратам, так как входит в Перечень сильнодействующих и ядовитых веществ. В последнее время описаны случаи недекларируемого добавления сибутрамина в БАД к пище с заявленным анорексигенным действием [15–17]. Для выявления и предотвращения случаев фальсификации необходимо разработать методики определения сибутрамина в многокомпонентных лекарственных препаратах и БАД к пище анорексигенного действия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аляутдин Р. Н. Фармакология: учебник. – 5-е издание, переработанное и дополненное. М.: ГЭОТАР – Медиа, 2016: 1104.
2. Харкевич Д. А. Фармакология: учебник. – 11-е издание, переработанное, дополненное и исправленное. М.: ГЭОТАР – Медиа, 2015. 736.

3. Araújo J., Martel F. Sibutramine effects on central mechanisms regulating energy homeostasis. *Current Neuropharmacology*. 2012; 10: 49–52. DOI: 10.2174/157015912799362788.
4. Schoor C., Oberholzer H., Bester M., Rooy M. The effect of sibutramine, a serotonin – norepinephrine reuptake inhibitor, on platelets and fibrin networks of male Sprague – dawley rats: A descriptive study. *Ultrastructural pathology*. 2014; 38: 1–7.
5. Калинин С. Ю., Ворслов Л. О., Тюзиков И. А., Тишова Ю. А. Влияние ожирения и инсулинорезистентности на репродуктивное здоровье женщин. *Медицинский совет*. 2015; 4: 82–87.
6. Регистр лекарственных средств России. Available at: <https://www.rlsnet.ru/>
7. Padwal S., Ehud U., Gareth W. A randomized trial of sibutramine in the management of obese type 2 diabetic patients treated with metformin. *Diabetes Care*. 2003; 26(1): 125–131.
8. Далантаева Н. С., Пигарова Е. А., Дзеранова Л. К. Центральные механизмы, регулирующие энергетический обмен, и сибутрамин. Ожирение и метаболизм. 2012; 3: 33–36.
9. Романцова Т. И. Сибутрамин: Эффективность и безопасность применения в рутинной клинической практике. *Ожирение и метаболизм*. 2015; 3: 18–24.
10. Винокуров В. Н., Чугаев В. В. Квалификация сбыта лекарственных средств, содержащих сибутрамин, через розничную аптечную сеть без рецепта. *Актуальные проблемы профилактики наркомании и противодействия правонарушениям в сфере легального и нелегального оборота наркотиков: материалы XV международной научно-практической конференции*. 2012; 2: 78–82.
11. Стерн К. И., Машченко П. С., Малкова Т. Л. Правовые аспекты производства биологически активных добавок для похудения, содержащих растительные компоненты. *Медицинская экспертиза и право*. 2014; 1: 3–8.
12. The 2006 Prohibited List World Anti-Doping Code/World Anti-Doping Agency. (WADA). Canada. Government Printing Office: Montreal, Quebec, 2005. Available at: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2006\\_EN.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_Prohibited_List_2006_EN.pdf).
13. The 2018 Prohibited List World Anti-Doping Code/World Anti-Doping Agency. (WADA). Canada. Government Printing Office: Montreal, Quebec, 2017. Available at: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/prohibited\\_list\\_2018\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/prohibited_list_2018_en.pdf).
14. Ершова Е. В., Кошмилова К. А., Галиева М. О. Сибутрамин: мифы и реальность. *Ожирение и метаболизм*. 2014; 4: 12–17.
15. Денисова М. Н., Семочкина С. А., Еганов А. А., Кардонский Д. А., Коваленко А. Е., Симонов Е. А., Сорокин В. И., Моргункова Ю. М., Кузовлев В. Ю. Современные проблемы правового регулирования оборота биологически активных добавок к пище, содержащих психоактивные и контролируемые вещества. *Северо-восточный научный журнал*. 2012; 1: 5–9.
16. Корчагина К. А., Туровская В. А. Эффективная профилактика распространения на территории России БАДов, содержащих в своем составе сильнодействующее вещество сибутрамин, как способ обеспечения защиты прав потребителей на безопасность товара и на полную, достоверную информацию о нем. *Наркоконтроль*. 2016; 2: 34–38.
17. Rocha T., Amaral J. S., Beatriz M. P. P. Oliveira. Adulteration of Dietary Supplements by the Illegal Addition of Synthetic Drugs: A Review // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016; 15: 43–62. DOI: 10.1111/1541-4337.12173.
18. DIRECTIVE 2002/46/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 10 June 2002 on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements (Text with EEA relevance). 2002. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002L0046&rid=3>.
19. Гайдукова Е. А., Сарычев И. И., Сыромятников С. В. Криминалистическое исследование препаратов, содержащих сибутрамин // *Судебная экспертиза*. 2008; 4: 61–67.
20. Стерн К. И., Малкова Т. Л. Разработка и валидация методики количественного определения производных сибутрамина в биологически активных добавках. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2016; 5: 39–43.
21. Chennaiah M., Veeraiah T., Kumar T., Venkateshwarlu G. Extractive spectrophotometric methods for determination of terbinafine hydrochloride in pharmaceutical formulation using some acidic triphenylmethane dyes. *International Journal of Chemical Sciences*. 2011; 9: 1451–1462.
22. Chorilli M., Bonfilio R., Chicarelli R. da S. et al. Development and validation of an analytical method by RP-HPLC for quantification of sibutramine hydrochloride in pharmaceutical capsules. *Analytical Methods*. 2011; 3: 985–990. DOI: 10.1039/c0ay00598c.
23. Huang Z., Xiao S., Luo D., Chen B., Yao S. Simultaneous determination of sibutramine and N-Di-desmethylsibutramine in dietary supplements for weight control by HPLC-ESI-MS. *Journal of chromatographic science*. 2008; 46: 707–711. DOI: 10.1093/chromsci/46.8.707.
24. Kilicarslan G., Imamoglu E., Kucuk A., Ozdemir A. UV spectrophotometric, derivative spectrophotometric and RP-HPLC-DAD determination of sibutramine. *Reviews in Analytical Chemistry*. 2011; 29: 169–196. DOI: 10.1515/REVAC.2010.29.3-4.169.
25. Maluf D. F., Farago P. V., Barreira S. M. V., Pedrosa C. F., Pontarolo R. Validation of an Analytical Method for Determination of Sibutramine Hydrochloride Monohydrate in Capsules by Uv-Vis Spectrophotometry. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2007; 26: 909–912.

## REFERENCES

1. Alyautdin R. N. Pharmacology: a textbook. – 5<sup>th</sup> edition, revised and enlarged. M.: GEOTAR – media, 2016; 1104 p. (In Russ.).
2. [Harkevich D. A. Pharmacology: a textbook. – 11<sup>th</sup> edition, revised, enlarged and revised. M.: GEOTAR – Media, 2015. 736 (In Russ.).
3. Araújo J., Martel F. Sibutramine effects on central mechanisms regulating energy homeostasis. *Current Neuropharmacology*. 2012; 10: 49–52. DOI: 10.2174/157015912799362788.
4. Schoor C., Oberholzer H., Bester M., Rooy M. The effect of sibutramine, a serotonin – norepinephrine reuptake inhibitor, on platelets and fibrin networks of male Sprague – dawley rats: A descriptive study. *Ultrastructural pathology*. 2014; 38: 1–7.
5. Kalinchenko S Yu., Vorslov L. O, Tyuzikov I. A, Tishova Yu. A. Impact of obesity and insulin resistance on women's reproductive health. *Medical advice*. 2015; 4: 82–87. (In Russ.).
6. Russian register of medicines]. Available at: <https://www.rlsnet.ru/> (in Russ.).
7. Padwal S., Ehud U., Gareth W. A randomized trial of sibutramine in the management of obese type 2 diabetic patients treated with metformin. *Diabetes Care*. 2003; 26(1): 125–131.
8. Dalantaeva N. S., Pigarova E. A., Dzeranova L. K. Central mechanisms regulating energy metabolism and sibutramine. *Obesity and metabolism*. 2012; 3: 33–36 (In Russ.).
9. Romantsova T. I. Sibutramine: Efficacy and safety of use in routine clinical practice. *Obesity and metabolism*. 2015; 3: 18–24. (In Russ.).
10. Vinokurov V. N., Chugayev V. V. Qualification of the sale of drugs containing sibutramine through a retail pharmacy chain without a prescription. *Actual problems of drug abuse prevention and countering offenses in the sphere of legal and illegal drug trafficking: materials of the XV international scientific-practical conference*. 2012; 2: 78–82 (In Russ.).
11. Stern K. I., Mashchenko P. S., Malkova T. L. Legal aspects of the production of dietary supplements for weight loss, containing herbal ingredients. *Medical expertise and law*. 2014; 1: 3–8 (In Russ.).
12. The 2006 Prohibited List World Anti-Doping Code/World Anti-Doping Agency. (WADA). Canada. Government Printing Office: Montreal, Quebec, 2005. Available at: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2006\\_EN.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_Prohibited_List_2006_EN.pdf).

13. The 2018 Prohibited List World Anti-Doping Code/World Anti-Doping Agency. (WADA). Canada. Government Printing Office: Montreal, Quebec, 2017. Available at: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/prohibited\\_list\\_2018\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/prohibited_list_2018_en.pdf).
14. Ershova E. V., Koshmilova K. A., Galiyeva M. O. Sibutramine: myths and reality. *Obesity and metabolism*. 2014; 4: 12–17 (In Russ.).
15. Denisova M. N., Semochkina S. A., Eganov A. A., Kardonsky D. A., Kovalenko A. E., Simonov E. A., Sorokin V. I., Morgunkova Yu. M., Kuzovlev V. Yu. Modern problems of legal regulation of the circulation of dietary supplements containing psychoactive and controlled substances. *Northeastern Scientific Journal*. 2012; 1: 5–9 (In Russ.).
16. Korchagina K. A., Turovskaya V. A. Effective prevention of the spread in Russia of dietary supplements containing a potent substance sibutramine as a way of ensuring the protection of consumers' rights to the safety of a product and to complete, reliable information about it. *Narcocontrol* 2016; 2: 34–38 (In Russ.).
17. Rocha T., Amaral J. S., Beatriz M. P. P. Oliveira. Adulteration of Dietary Supplements by the Illegal Addition of Synthetic Drugs: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016; 15: 43–62. DOI: 10.1111/1541-4337.12173.
18. DIRECTIVE 2002/46/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 10 June 2002 on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements (Text with EEA relevance). 2002. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002L0046&rid=3>.
19. Gaidukova E. A., Sarychev I. I., Syromyatnikov S. V. Forensic study of drugs, receive sibutramine. *Forensic examination*. 2008; 4: 61–67 (In Russ.).
20. Stern K. I., Malkova T. L. Development and validation of methods for the quantitative determination of sibutramine derivatives in dietary supplements. *Forensic-medical examination*. 2016; 5: 39–43. (In Russ.).
21. Chennaiah M., Veeraiah T., Kumar T., Venkateshwarlu G. Extractive spectrophotometric methods for determination of terbinafine hydrochloride in pharmaceutical formulation using some acidic triphenylmethane dyes. *International Journal of Chemical Sciences*. 2011; 9: 1451–1462.
22. Chorilli M., Bonfilio R., Chicarelli R. da S. et al. Development and validation of an analytical method by RP-HPLC for quantification of sibutramine hydrochloride in pharmaceutical capsules. *Analytical Methods*. 2011; 3: 985–990. DOI: 10.1039/c0ay00598c.
23. Huang Z., Xiao S., Luo D., Chen B., Yao S. Simultaneous determination of sibutramine and N-Di-desmethylsibutramine in dietary supplements for weight control by HPLC-ESI-MS. *Journal of chromatographic science*. 2008; 46: 707–711. DOI: 10.1093/chromsci/46.8.707.
24. Kilcarslan G., Imamoglu E., Kucuk A., Ozdemir A. UV spectrophotometric, derivative spectrophotometric and RP-HPLC-DAD determination of sibutramine. *Reviews in Analytical Chemistry*. 2011; 29: 169–196. DOI: 10.1515/REVAC.2010.29.3-4.169.
25. Maluf D. F., Farago P. V., Barreira S. M. V., Pedrosa C. F., Pontarolo R. Validation of an Analytical Method for Determination of Sibutramine Hydrochloride Monohydrate in Capsules by Uv-Vis Spectrophotometry. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2007; 26: 909–912.





ФОРУМ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ УПАКОВКИ

# ФАРМАПАК

## VIII Международный форум ФАРМАПАК Выставка упаковочных материалов, оборудования и технологий для фармкомпаний 2019

### ВЫСТАВКА:

Решения по маркировке лекарственных препаратов, фармацевтическая упаковка, оборудование и программное обеспечение для фармацевтической и косметической промышленности

### ДЕЛОВАЯ ПРОГРАММА:

- Опыт и перспективы внедрения системы маркировки в России
- Повышение эффективности фармпроизводств
- Мотивация и обучение фармперсонала



**8** ЛЕТ  
ФАРМАПАК

**350**  
ПАРТНЁРОВ

**1000**  
ПОСЕТИТЕЛЕЙ



РЕАЛЬНЫЕ КЕЙСЫ  
ОТ ФАРМКОМПАНИЙ



АКТУАЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ  
ОБ ИННОВАЦИЯХ НА РЫНКЕ



ИНТЕРАКТИВНОЕ ОБЩЕНИЕ  
С ЭКСПЕРТАМИ И ПАРТНЕРАМИ

**СТАТЬ УЧАСТНИКОМ  
ПОСЕТИТЬ ВЫСТАВКУ**

[www.upak-forum.ru](http://www.upak-forum.ru)  
[info@upak-forum.ru](mailto:info@upak-forum.ru)

**МОСКВА**

**23-25 апреля 2019 года**

**ЦВК ЭКСПОЦЕНТР**

КАК ЭТО БЫЛО  
В 2018 ГОДУ:



DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-103-107  
УДК 811.3:615.1

## ПРОГРАММА АДАПТАЦИИ И ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ПЕРСОНАЛА В РАМКАХ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА АПТЕЧНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ (ОБЗОР)

Н. Г. Золотарева<sup>1</sup>, С. В. Стрелков<sup>1\*</sup>, В. А. Стрелкова<sup>1</sup>

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

\*Контактное лицо: Стрелков Станислав Викторович. E-mail: stanislav.strelkov@pharminnotech.com

Статья получена: 22.11.2018. Статья принята к печати: 28.12.2018

### Резюме

**Введение.** В настоящей статье изложен порядок управления персоналом в аптечной организации с точки зрения действующих требований Надлежащей аптечной практики (НАП) и Системы менеджмента качества (СМК). Ключевым элементом НАП и СМК является персонал, поэтому система управления персоналом должна базироваться на принципах и основах, свойственным данным концепциям, и быть адекватной действующей системе качества в аптечной организации.

**Текст.** Управление качеством предполагает использование системного и процессного подходов. При этом аптечным организациям необходимо провести ряд мероприятий по соответствующему повышению качества рабочей силы, ее деятельности и вовлечению в процесс формирования НАП и СМК. Кроме того, профессиональное развитие персонала, является важнейшим условием и залогом успешного функционирования системы качества, а также эффективности, работоспособности и благополучия организации в целом. Для реализации требований системы менеджмента качества должны быть привлечены специалисты службы персонала, руководители всех уровней, а также рядовые сотрудники. Достижение высокого уровня системы менеджмента качества на предприятии возможно только при наличии высококвалифицированного персонала, обладающего определенными компетенциями. Согласно требованиям Надлежащей аптечной практики, вступившим в силу 1 марта 2017 года, в аптечной организации должна быть внедрена Программа адаптации персонала. Адаптация персонала – это сложный и длительный процесс приспособления новых сотрудников к содержанию, условиям трудовой деятельности и социальной среде организации, постепенное включение нового работника в профессиональную деятельность и коллектив, в фармацевтической отрасли он имеет свои особенности и специфику. В статье предложен вариант программы адаптации для молодого сотрудника, включающей различные аспекты и формы ее проведения, который может оказать существенную помощь руководителям аптечных организаций и специалистам службы персонала при обучении новых сотрудников. Помимо программы адаптации, аптечная организация должна разработать и внедрить систему обучения, соответствующую специфике производственных процессов организации. Потребность в обучении персонала определяется специалистом по обучению, который ежегодно и ежеквартально формирует План-график внешнего обучения персонала. При составлении Плана-графика обучения учитываются планы разработки и актуализации документов организации, которые касаются рабочей деятельности сотрудника. Непосредственно обучение по документам проводится руководителем структурного подразделения, результаты контроля знаний должны быть зафиксированы им в карточках внутреннего обучения сотрудника. В отличие от традиционного подхода к организации процесса обучения персонала в аптечной организации, в настоящее время рационально внедрять типовые и индивидуальные матрицы обучения.

**Заключение.** Авторы высказывают свое видение стратегии, планирования, управления профессиональным ростом, обучения новым знаниям и навыкам персонала в системе менеджмента качества.

**Ключевые слова:** аптечная организация, надлежащая аптечная практика, система менеджмента качества, программа адаптации, профессиональное развитие персонала, кадровая политика.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Золотарева Н. Г., Стрелков С. В., Стрелкова В. А. Программа адаптации и профессиональное развитие персонала в рамках системы менеджмента качества аптечной организации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 103–107.

## THE PROGRAM OF ADAPTATION AND PROFESSIONAL DEVELOPMENT OF PERSONNEL WITHIN A QUALITY MANAGEMENT SYSTEM OF THE PHARMACEUTICAL ORGANIZATION (REVIEW)

N. G. Zolotareva<sup>1</sup>, S. V. Strelkov<sup>1\*</sup>, V. A. Strelkova<sup>1</sup>

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

\*Corresponding author: Stanislav V. Strelkov. E-mail: stanislav.strelkov@pharminnotech.com

Received: 22.11.2018. Accepted: 28.12.2018

### Abstract

**Introduction.** This article describes the procedure for personnel management in a pharmacy organization in terms of the current requirements of Good Pharmacy Practice (GAP) and Quality Management System (QMS). A key element of the NSP and QMS is staff, so the HR management system should be based on the principles and foundations inherent in these concepts and be adequate to the current quality system in the pharmacy organization.

**Text.** Quality management involves the use of systematic and process approaches. In doing so, pharmacies need to take a number of steps to improve the quality of the workforce, its activities and involvement in the process of formation of NPS and QMS. In addition, the professional development of staff is an essential condition and key to the successful functioning of the quality system, as well as the efficiency, performance and well-being of the organization as a whole. To implement the requirements of the quality management system, specialists of the personnel department, managers of all levels, as well as ordinary employees should be involved. Achieving a high level of quality management system at the enterprise is possible only in the presence of highly qualified personnel with certain competences. According to the requirements of Good Pharmacy Practice, which came into effect on March 1, 2017, the Pharmacy should implement the Personnel Adaptation Programme. Adaptation is a complex and time-consuming process of adjusting new employees to the content, working conditions and social environment of the organization, the gradual inclusion of new employees in the professional activities and team, and the pharmaceutical industry has its own characteristics and specifics. In the article the variant of the program of adaptation for the young employee including various aspects and forms of its carrying out which can render the essential help to heads of the drugstore organizations and experts of service of the personnel at training of new employees is offered. In addition to the adaptation program, the pharmacy organization should develop and implement a training system that corresponds to the specifics of the organization's production processes. The training needs of staff are determined by the training specialist, who annually and on a quarterly basis forms a schedule for external training of staff. The training schedule takes into account the plans for the development and updating of documents of the organization, which relate to the working activities of the employee. Training according to the documents is carried out by the head of the structural subdivision, the results of knowledge control should be recorded by him in the internal training cards of the employee. In contrast to the traditional approach to the organization of personnel training in the pharmacy organization, it is now rational to introduce standard and individual training matrices.

**Conclusion.** The authors express their vision of strategy, planning, professional growth management, training of new knowledge and skills of personnel in the quality management system.

**Keywords:** pharmaceutical organization, Good Pharmacy Practice, quality management system, program of adaptation, professional development of personnel.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Zolotareva N. G., Strelkov S. V., Strelkova V. A. The program of adaptation and professional development of personnel within a quality management system of the pharmaceutical organization. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 103–107.



## ВВЕДЕНИЕ

В Российской Федерации с 1 марта 2017 г. вступил в силу Приказ МЗ РФ от 31.08.2017 г. № 647н «Об утверждении Правил надлежащей аптечной практики лекарственных препаратов для медицинского применения». Правила направлены на обеспечение населения качественными, эффективными и безопасными товарами аптечного ассортимента, а также оптимизацию деятельности аптек по различным направлениям их работы. Важным элементом НАП обозначена разработка, документальное оформление, внедрение и поддержание в рабочем состоянии СМК. Безусловно, функционирование СМК на должном уровне возможно только при участии квалифицированного персонала, обладающего определенными компетенциями.

Персонал является одним из ключевых ресурсов организации. Человеческий фактор может влиять на качество продукции и услуг, оказываемых организацией, поэтому важным лицензионным требованием при осуществлении фармацевтической деятельности является соответствующее специальное образование, квалификация персонала и, в случае руководящих должностей, стаж. Кроме того, анализ принципов всеобщего менеджмента качества, таких как лидерство руководства, вовлечение персонала, постоянное улучшение деятельности организации, также указывает на важную роль персонала [1]. Поэтому, для обеспечения активного участия персонала в создании и поддержании рабочей СМК, необходимо соответствующее обучение специалистов внутри самой аптечной организации. Планирование обучения сотрудника осуществляется после приема на работу или при переводе сотрудника на другую должность.

Управление персоналом в СМК включает планирование штатной численности персонала, кадровый учет, анализ подготовки и оценку компетенций персонала, своевременное обучение, что способствует профессиональному развитию персонала. Профессиональное развитие персонала – это процесс, включающий выработку стратегии, планирование и управление профессиональным ростом, обучение новым знаниям и навыкам.[2] Более подробно в статье будут рассмотрены два элемента профессионального развития персонала с точки зрения СМК:

- введение в должность и программа адаптации;
- порядок обучения персонала.

## ВВЕДЕНИЕ В ДОЛЖНОСТЬ И ПРОГРАММА АДАПТАЦИИ

Для вновь принятых работников в соответствии с локальными актами аптечной организации должна быть внедрена Программа адаптации. Также нормативными документами установлены требования регу-

лярной проверки квалификации, знаний и опыта таких работников. [3] Период адаптации также может быть установлен для сотрудников, которые приобретают новую должность в процессе служебно-профессионального продвижения.

Адаптация – это процесс ознакомления новых сотрудников с деятельностью организации и вливания в производственную среду.

В рамках Программы адаптации решаются следующие задачи:

- ✓ приобщение к корпоративной культуре и политике качества организации;
- ✓ помощь в осознании целей и задач организации и структурного подразделения;
- ✓ уменьшение дискомфорта первых дней работы;
- ✓ снижение количества возможных ошибок, связанных с новой работой;
- ✓ оценка квалификации и потенциала сотрудника;
- ✓ снижение текучести кадров;
- ✓ развитие позитивного и конструктивного отношения к работе у персонала.

Программу адаптации сотрудников целесообразно разделять на два этапа:

1. Первичное обучение (с момента принятия на работу до времени допуска к самостоятельной работе), которое включает:

1.1. Предварительное ознакомление сотрудника с предприятием осуществляет уполномоченный сотрудник HR (Human Resource) службы. Специалист по обучению знакомит нового сотрудника с основными положениями и требованиями СМК организации, доводит до сведения сотрудника политику и цели в области качества. Специалист по обучению на основании типовой матрицы по обучению составляет матрицу индивидуального обучения для данного сотрудника, где отмечает внутренние нормативные документы, которые сотрудник обязательно должен изучить, чтобы получить допуск к самостоятельной работе.

1.2. Проведение комплексного инструктажа (вводный при приеме на работу, первичный и вторичный на рабочем месте, инструктаж по технике безопасности и охране труда).

1.3. Обучение на рабочем месте, в рамках которого руководитель структурного подразделения вводит нового сотрудника в должность, а именно:

- ✓ знакомит со спецификой работы структурного подразделения;
- ✓ детально разъясняет правила работы, требования к выполнению работы и круг обязанностей;
- ✓ знакомит с правилами поведения на территории организации;
- ✓ представляет сотрудника его коллегам и наставнику;
- ✓ разъясняет цели и задачи на период адаптации;
- ✓ сообщает функции других сотрудников подразделения и порядок взаимодействия с ними и наставником;



- ✓ уточняет расположение рабочего места, его техническую оснащенность, комплектацию;
- ✓ проводит актуализацию знаний о законодательстве Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств и охране здоровья граждан, защите прав потребителей, правилах личной гигиены, по порядку оказания фармацевтических услуг, в том числе фармацевтического консультирования и применения медицинских изделий в домашних условиях.

В течение периода адаптации обучение и работа сотрудника курируется наставником, назначаемым руководителем структурного подразделения. Наставник оказывает помощь сотруднику в освоении стандартных операционных процедур, рабочих инструкций, в ведении записей. Руководитель несёт ответственность за то, что назначенный им специалист соответствует предъявляемым к наставникам требованиям, обладает необходимыми профессиональными и социально-психологическими характеристиками. При назначении наставника специалист по обучению делает запись об этом в матрице индивидуального обучения, а наставник, в свою очередь, подписывает матрицу, подтверждая принятие на себя возложенных обязанностей.

Наставник в период адаптации обязан:

- ✓ ознакомить сотрудника со структурой и расположением производственных, служебных и бытовых помещений организации;
  - ✓ помогать сотруднику в осознании и понимании индивидуальной ответственности за соблюдение требований СМК, а также о правилах документирования и ведения записей;
  - ✓ контролировать выполнение правил внутреннего трудового распорядка, охраны труда и техники безопасности;
  - ✓ ставить перед новым сотрудником конкретные задачи (с определенным сроком их выполнения и определенным конечным результатом) и, если необходимо, оказывать помощь, а также контролировать и оценивать самостоятельное выполнение сотрудником порученной ему работы;
  - ✓ проводить первичное обучение в соответствии с обязанностями сотрудника;
  - ✓ давать заключение о возможности допуска нового сотрудника к самостоятельной работе.
- Наставник имеет право:
- ✓ требовать от нового сотрудника рабочие отчеты (в установленной форме);
  - ✓ рекомендовать срок первичного обучения, исходя из личной оценки освоения новым сотрудником необходимых навыков, необходимых для выполнения работы;
  - ✓ вносить предложения руководителю структурного подразделения о поощрении или применении мер дисциплинарного воздействия к новому сотруднику;

- ✓ предлагать руководству мероприятия, способствующие повышению эффективности обучения.

## 2. Допуск к самостоятельной работе.

Допуск к самостоятельной работе получают сотрудники, изучившие внутренние нормативные документы, определённые в матрице индивидуального обучения, и подтвердившие в ходе работы под руководством наставника наличие необходимых для практической работы навыков. Ответственные сотрудники (руководитель структурного подразделения и наставник) проставляют отметку о допуске в матрице индивидуального обучения и личной карточке обучающегося.

## ПОРЯДОК ОБУЧЕНИЯ ПЕРСОНАЛА

Аптечная организация должна разработать и внедрить систему обучения, которая выстраивает обучение в соответствии со спецификой производственных процессов организации, своевременно выявляет потребности в обучении, определяет планирование и бюджетирование обучения, его организацию и контроль результативности. Руководство организации должно осознавать собственную ответственность за поддержание действенной и эффективной системы обучения персонала, осуществляя все необходимые действия от планирования до оценки результатов обучения. Общая система обучения предусматривает обучение основным требованием и принципам НАП, включая СМК.

Процесс обучения включает: подготовительный этап, планирование обучения, проведение обучения, оценка эффективности обучения и внесение корректировок с целью улучшения процесса (рисунок 1). Обучение может быть внешним или внутренним, плановым или внеплановым, первичным или периодическим.

Как правило, обучение персонала детально планируется, однако, в ряде случаев возможно внеплановое обучение, например:

- ✓ при получении внепланового приглашения на внешнее обучение;
- ✓ в случае выявления несоответствий при внешнем или внутреннем аудите, связанных с подготовкой персонала;
- ✓ при изменении внутренней и внешней нормативной документации;
- ✓ в качестве коррекции при выявленных вне аудита несоответствиях.

Потребность в обучении персонала определяется специалистом по обучению, в основе которого лежит анализа результатов деятельности структурных подразделений и поставленных перед ними задач в области качества.

Специалист по обучению ежегодно и ежеквартально формирует План-график внешнего обучения персонала. При составлении Плана-графика обучения

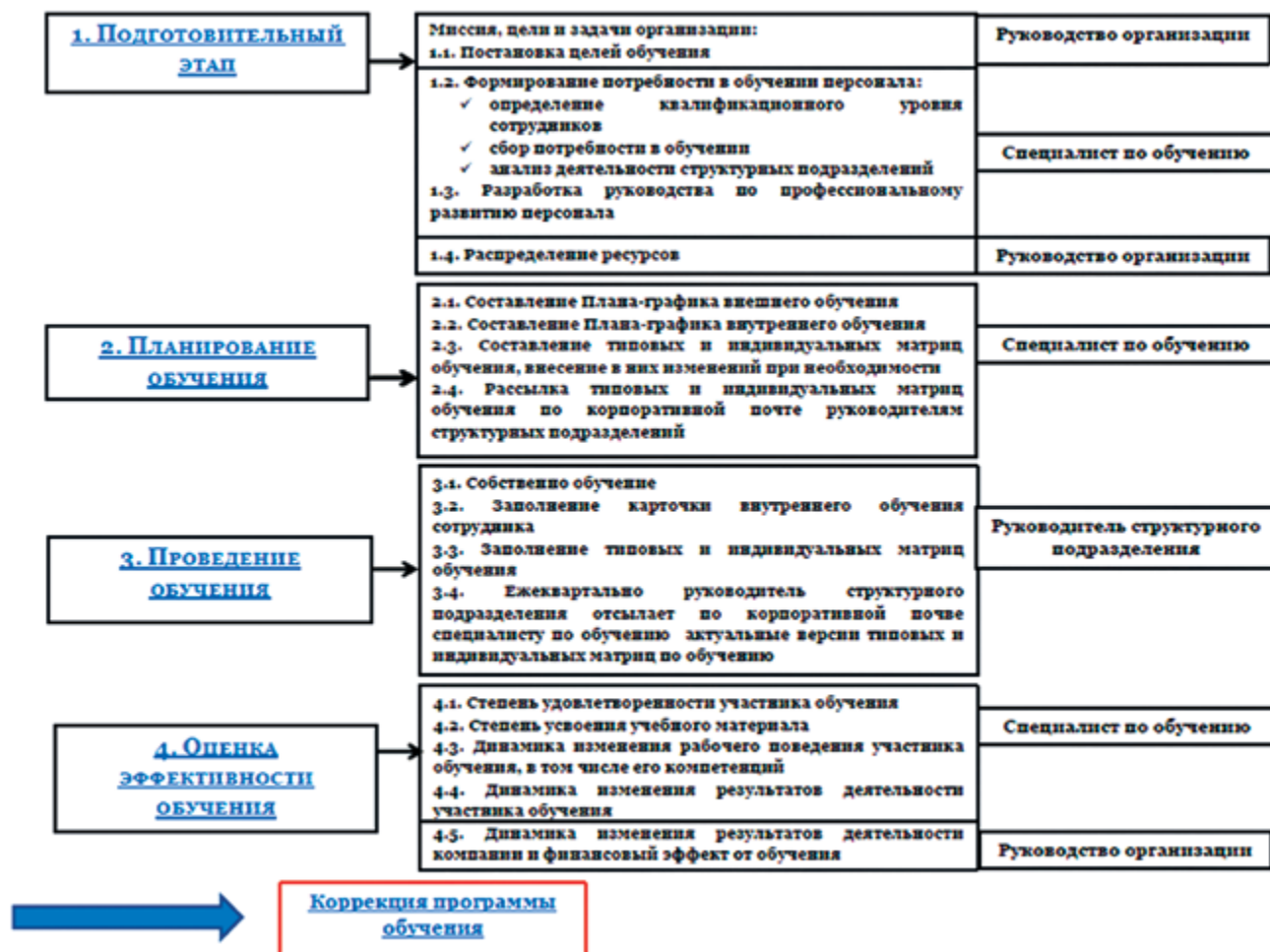


Рисунок 1. Блок-схема организации процесса обучения

Picture 1. The flowchart of the organization of the learning process

учитываются планы разработки и актуализации документов предприятия, которые касаются рабочей деятельности сотрудника. Непосредственно обучение по документам проводится руководителем структурного подразделения, результаты контроля знаний должны быть зафиксированы им в карточках внутреннего обучения сотрудника.

В отличие от традиционного подхода к организации процесса обучения персонала в аптечной организации, в настоящее время рационально внедрять типовые и индивидуальные матрицы обучения.

Типовая матрица обучения – это единая матрица, где для каждой должности указаны внутренние нормативные документы, по которым необходимо провести обучение сотрудников. Матрица индивидуального обучения – текущий документ, отражающий статус обучения конкретного сотрудника. Эти документы используются для планирования процесса обучения специалистом по обучению.

Ответственным за поддержание в актуальном состоянии матриц обучения своих сотрудников является руководитель структурного подразделения.

Ежеквартально типовую матрицу согласовывают со специалистом по обучению, который в свою очередь анализирует типовые матрицы и на их основе составляет Планы-графики обучения.

Специалист по обучению вносит изменения в матрицы индивидуального обучения в следующих случаях:

- ✓ после введения в действие нового документа;
- ✓ при изменении версии существующего документа;
- ✓ после проведения периодических и первичных обучений;
- ✓ после перехода сотрудника на другую должность или изменения его должностных обязанностей.

В случае изменения существующего или появления нового нормативного документа специалист по документации предоставляет информацию специалисту по обучению для внесения необходимых изменений в матрицы: названия и коды документов, а также данные сотрудников.

Допустимо ведение матриц в электронном виде, например в формате таблиц Excell. В строки таблицы/матрицы заносят названия нормативных доку-

ментов, их внутренние коды, в столбцы – должности, фамилии и инициалы сотрудников, для которых планируется обучение, на пересечении строк и столбцов – плановую дату обучения по документу и его глубину. Поскольку матрицы являются изменяемыми документами, то специалист по обучению проставляет в электронном документе и при печати дату и подпись, подтверждая его актуальность. О внесенных изменениях в матрицы специалист по обучению сообщает руководителям структурных подразделений по электронной почте.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Надлежащим образом оформленная и функционирующая СМК – гарант высокого профессионализма работников аптек при осуществлении фармацевтической деятельности, а также повышения их ответственности за обеспечение качества отпускаемых товаров и оказываемых услуг.
2. Важным требованием СМК является внедрение Программы адаптации, которая должна включать первичное обучение персонала с учетом матрицы индивидуального обучения и допуск к самостоятельной работе.
3. Профессиональное развитие персонала с точки зрения СМК предполагает разработку и внедрение

системы обучения, планирования, бюджетирования, создание матриц обучения и контроля его результативности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Илюхина Л. А., Семенова Е. Г. Роль персонала в обеспечении требований качества. *Евразийский союз ученых*. 2015; 4(13). Available at: [www.uroasia-science.ru/ekonomicheskie-nauki/rol-personala-v-obespechenii-trebovanij-kachestva/](http://www.uroasia-science.ru/ekonomicheskie-nauki/rol-personala-v-obespechenii-trebovanij-kachestva/) (accessed: 17.10.2018).
2. Профессиональное развитие персонала: когда оно необходимо / Директор по персоналу. Available at: <https://www.hr-director.ru/article/66253-qqq-16-m8-17-08-2016-professionalnoe-razvitie-personala/> (accessed: 10.10.2018).
3. Приказ МЗ РФ «Об утверждении Правил надлежащей аптечной практики лекарственных препаратов для медицинского применения» № 647н от 31.08.2016 г.

## REFERENCES

1. Ilyuhina L. A., Semenova E. G. The role of staff in meeting quality requirements. *Eurasian Union of Scientists*. 2015. 4(13). Available at: [uroasia-science.ru/ekonomicheskie-nauki/rol-personala-v-obespechenii-trebovanij-kachestva/](http://uroasia-science.ru/ekonomicheskie-nauki/rol-personala-v-obespechenii-trebovanij-kachestva/) (accessed: 17.10.2018) (in Russ.).
2. Professional development of staff: when it is needed / Director of Personnel. Available at: <https://www.hr-director.ru/article/66253-qqq-16-m8-17-08-2016-professionalnoe-razvitie-personala/> (accessed: 10.10.2018) (in Russ.).
3. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation «On Approval of the Rules of Good Pharmacy Practice of Medicines for Medical Use» № 647n of 31.08.2016 (in Russ.).



DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-108-112  
УДК 543.544; 615.074

## ПРОВЕРКА ПРИГОДНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ: ВЛИЯНИЕ ПОПРАВочНЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ И ПОЗДНО ВЫХОДЯЩИХ ПИКОВ ПРИМЕСЕЙ НА ТРЕБОВАНИЕ К ОТНОШЕНИЮ СИГНАЛ/ШУМ (ОБЗОР)

Н. А. Эпштейн<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> – Центр регистрации и разработки лекарственных средств ООО «ИРВИН 2», 115446, Россия, г. Москва, Коломенский проезд, 13А

\*Контактное лицо: Эпштейн Наум Аронович. E-mail: naumepshtein@gmail.com

Статья получена: 30.11.2018. Статья принята к печати: 18.01.2019

### Резюме

**Введение.** В случае методик определения примесей нередко возникают проблемы, связанные как с установлением, так и с проверкой выполнения требования к необходимой чувствительности хроматографической системы.

**Текст.** Рассмотрено влияние поправочных коэффициентов и поздно выходящих пиков примесей на требование к отношению сигнал/шум (S/N) для проверки пригодности хроматографической системы.

**Заключение.** Даны рекомендации как обнаружить ситуации, при которых требование  $S/N \geq 10$  недостаточно для надежного детектирования пиков всех примесей (родственных веществ), и при этом как скорректировать концентрацию испытуемого раствора и/или требование к отношению S/N для контроля пригодности системы.

**Ключевые слова:** отношение сигнал/шум, пригодность системы, поправочные коэффициенты, поздно выходящие пики, примеси, родственные вещества.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Эпштейн Н.А. Проверка пригодности хроматографической системы: влияние поправочных коэффициентов и поздно выходящих пиков примесей на требование к отношению сигнал/шум. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 108–112.

## CHROMATOGRAPHIC SYSTEM SUITABILITY TESTING: INFLUENCE OF CORRECTION FACTORS AND LATE ELUTING PEAKS OF IMPURITIES ON THE REQUIREMENT FOR THE SIGNAL-TO-NOISE RATIO (REVIEW)

N. A. Epshtein<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> – Center of registration and development of medicines LLC «IRVIN 2», 13A, Kolomensky passage, Moscow, 115446, Russia

\*Corresponding author: Naum A. Epshtein. E-mail: naumepshtein@gmail.com

Received: 30.11.2018. Accepted: 18.01.2019

### Abstract

**Introduction.** In case of methods of impurities determination quite often there are problems connected both with establishment and with check of implementation of the requirement to necessary sensitivity of a chromatographic system.

**Text.** Influence of correction factors and late eluting peaks of impurities on the requirement for the signal-to-noise ratio (S/N) for chromatographic system suitability testing is considered.

**Conclusion.** The recommendations are provided how to detect situations at which the requirement of  $S/N \geq 10$  is insufficient for reliable detecting peaks of all impurities (related substances) and therewith how to correct concentration of test solution and/or the requirement to S/N for system suitability testing.

**Keywords:** signal-to-noise ratio, system suitability, correction factors, late eluting peaks, impurities, related substances.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Epshtein N. A. Chromatographic system suitability testing: influence of correction factors and late eluting peaks of impurities on the requirement for the signal-to-noise ratio. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 108–112.

## ВВЕДЕНИЕ

Проверка пригодности хроматографической системы (ППХС, SST – system suitability testing)) является обязательной процедурой для всех хроматографических методик контроля качества фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. Для методик определения содержания основных веществ установление и проверка выполнения требований ППХС обычно не вызывает проблем, так как контролируются такие характеристики пиков как число теоретических тарелок (N), фактор асимметрии ( $T_{0.05}$ ), относительное стандартное отклонение площади пика (RSD) и редко – разрешение между пиками (Rs) [1]. Однако в слу-

чае методик определения примесей нередко возникают проблемы, связанные как с установлением, так и с проверкой выполнения требования к необходимой чувствительности хроматографической системы (Sensitivity testing).

Согласно рекомендациям, опубликованным в [2–4], концентрация раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (ПЧХС) должна соответствовать порогу игнорирования примесей (disregard limit; чаще всего 0,05%), а отношение сигнал/шум (S/N), рассчитанное для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС, должно быть не меньше 10 [2–4]. Эти рекомендации являют-

ся рамочными и не учитывают возможные особенности анализируемых объектов и получаемых хроматограмм. Поэтому не удивительно, что у разработчиков и пользователей методик определения примесей часто возникают вопросы, связанные с необходимой чувствительностью хроматографической системы и ее проверкой. Ответы на ряд таких вопросов можно найти в публикации [5]; в ней подробно рассмотрены критерии для выбора определенной концентрации раствора ПЧХС, условия, при которых следует брать концентрацию раствора ПЧХС на уровне большем или меньшем, чем 0,05%, случаи, когда нижняя граница требования к  $S/N$  может быть  $<10$  и когда можно не использовать раствор ПЧХС, то есть не проверять чувствительность хроматографической системы. Там же указан и обоснован критерий приемлемости при наличии остаточного пика основного вещества на хроматограмме blank (холостого опыта): *площадь остаточного пика на хроматограмме blank не должна превышать 10% от площади пика основного вещества на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы*<sup>1</sup>.

**Цель статьи:** в дополнение к [5] рассмотреть ситуации, при которых нижняя граница требования  $S/N \geq 10$ , то есть 10, может оказаться недостаточно большой для надежного детектирования пиков примесей; дать рекомендации, как обнаружить такие ситуации и при этом как скорректировать концентрацию испытуемого раствора и/или требование к отношению  $S/N$  для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего поясним, почему в качестве нижней границы требования к  $S/N$  для раствора ПЧХС в фармакопеех обычно указывают  $S/N = 10$  [2–4]. Это связано с концентрацией раствора ПЧХС. Известно, что концентрация раствора ПЧХС должна соответствовать порогу игнорирования примесей (disregard limit) [2], и поэтому концентрацию раствора ПЧХС берут на определенном уровне относительно концентрации испытуемого раствора, выбираемом специальным образом [5]. С другой стороны, концентрация раствора ПЧХС должна быть такой, чтобы можно было воспроизводимо (надежно) определять высоту пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС. Для методик определения примесей общепринятым критерием воспроизводимости площадей и, как следствие, высот пиков является требование: относительное стандартное отклонение площади пика ... не должно превышать 5,0%. Согласно теории, для пиков гауссовой формы относительное стандартное отклонение площади пика (RSD) можно выразить через отношение  $S/N$  [6]:

$$RSD \approx 50/(S/N), \quad (1)$$

<sup>1</sup> Такой критерий очень важен, так как на практике нередко встречаются ситуации, когда невозможно полностью отмыть хроматографическую колонку от остаточного пика основного вещества.

или

$$S/N \approx 50/(RSD). \quad (2)$$

Подставив в (2)  $\%RSD=5,0$  (т.е. 5,0%), получаем  $S/N \approx 10$ . Это, по-видимому, и являлось прямым или косвенным (см. примечание) основанием для выбора значения 10 в качестве нижней границы требования к  $S/N$  при проверке чувствительности хроматографической системы.

*Примечание.* Могут сказать, что нижняя граница требования к  $S/N = 10$  выбрана из-за того, что  $S/N=10$  соответствует пределу количественного определения (LOQ) [2, 7–9], устанавливаемому для хроматографических методик по отношению сигнал/шум базовой линии. Однако выбор  $S/N=10$  в качестве критерия для LOQ тоже с большой вероятностью основывается на формулах (1) и (2), так как вряд ли случайно значение  $S/N=10$  при LOQ точно соответствует  $RSD=5,0\%$  по формуле (2).

Важно подчеркнуть, что введение раствора ПЧХС в проверку пригодности хроматографической системы предполагает контроль необходимой чувствительности хроматографической системы по отношению ко всем примесям. То есть предполагается, что если у пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС отношение  $S/N$  будет  $\geq 10$ , то у всех примесей с содержанием на уровне порога игнорирования примесей отношение  $S/N$  будет не меньше предела обнаружения (LOD). Так как в соответствии с ICH при LOD отношение  $S/N=3$  [8], то выполнение требования  $S/N \geq 10$  у пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС должно означать, что у всех примесей при их содержании на уровне порога игнорирования примесей с большой вероятностью  $S/N \geq 3$ . Практика показала, что в большинстве случаев это выполняется. Однако могут быть ситуации, при которых нижняя граница требования  $S/N \geq 10$  для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС (то есть  $S/N \approx 10$ ) оказывается недостаточной для надежного детектирования всех примесей: некоторые примеси могут быть не видны или у них  $S/N < 3$  при содержании (%) на уровне порога игнорирования примесей. Можно выделить 2 основных индикатора для такого риска:

- **Первый индикатор:** время выхода последнего пика по результатам стрессовых исследований при валидации методики определения примесей или продолжительность хроматограммы испытуемого раствора значительно превышает время удерживания основного вещества (ориентировочно в 4 раза и более).

Этот индикатор связан с тем, что при увеличении времени выхода пика, согласно теории [6], происходит его уширение и, как следствие, уменьшение высоты вплоть до такой, при которой  $S/N < 3$  – то есть меньше предела обнаружения [8] даже при выполнении условия  $S/N \approx 10$  для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС. Наглядный пример такой ситуации для поздно выходящей примеси приведен на модельной хроматограмме на рисунке 1 (пояснение дано ниже). Поэтому, если при стрессовых исследова-

ниях [10] обнаружены поздно выходящие пики примесей и/или продолжительность хроматограммы для определения примесей значительно превышает время выхода пика основного вещества, то следует проверить, все ли примеси детектируются. Такую проверку можно провести, например, следующим образом. Берут хроматограф с диодно-матричным детектором и образец препарата (модельной смеси) или субстанции – в зависимости от объекта анализа, на конце срока годности (долгосрочное или ускоренное хранение)<sup>1</sup>. Хроматографируют при номинальных условиях испытуемый раствор (концентрация основного вещества  $C_o$ ), а также раствор плацебо или blank (при анализе субстанций) – для идентификации пиков плацебо и системных пиков. Сравнивают хроматограммы этих растворов с хроматограммами типа MaxPlot фирмы Waters [11] – на них пики веществ имеют максимальную высоту, так как на хроматограмму выводятся максимальные значения оптической плотности в рассматриваемом диапазоне длин волн (обычно от 200 до 350 нм). Делают вывод об отсутствии или о наличии дополнительных пиков примесей, то есть тех, которые имеются на хроматограмме испытуемого раствора, выведенной в режиме MaxPlot, однако, отсутствуют на хроматограмме этого раствора при рабочей длине волны. Если такие пики примесей имеются, то:

- в случае разработки методики увеличивают концентрацию испытуемого раствора от  $C_o$  вплоть до такой минимальной концентрации ( $C_p$ ) при которой у всех обнаруженных дополнительных пиков примесей отношение  $S/N \geq 3$ . Затем раствор с концентрацией  $C_D$  используют как испытуемый раствор по разрабатываемой методике. Характерно, что в подобном случае при сохранении концентрации испытуемого раствора  $C_o$  невозможно обеспечить необходимую чувствительность хроматографической системы даже при ужесточении требования от  $S/N \geq 10$  до  $S/N \geq 50$  и более для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС;

- если не могут увеличить концентрацию испытуемого раствора до  $C_p$ , то рассматривают возможность увеличения объема пробы при инъекции, увеличения скорости потока подвижной фазы, введения/коррекции градиента, изменения рабочей длины волны и т.д.;
- при апробации/трансфере методики делают вывод о ее недостаточной чувствительности.

*Примечание:* при разработке методик определения примесей рекомендуем всегда проводить изложенную выше проверку наличия дополнительных пиков примесей.

- **Второй индикатор:** если на хроматограмме раствора ПЧХС  $S/N \approx 10$  или немного больше десяти и есть примеси с поправочным коэффициентом  $F > 1,25$ .

<sup>1</sup> Если времени мало, то можно использовать ускоренное хранение модельной смеси препарата при температуре 60 °C и относительной влажности  $W=75\%$  в течение 30 дней (эквивалент 2 лет) [13].

Если есть примеси, которые соответствуют второму индикатору, то в общем случае имеется риск того, что у такой примеси отношение  $S/N$  будет меньше 3 даже при выполнении требования  $S/N \approx 10$  у пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС. Поэтому для обеспечения необходимой чувствительности хроматографической системы целесообразно поступать следующим образом.

**При отсутствии образцов примесей, удовлетворяющих второму индикатору,** можно воспользоваться рекомендацией европейского руководства [2], в котором для примесей с поправочным коэффициентом большим, чем 1,25 предлагается корректировать требование к  $S/N$  путем умножения 10 на значение поправочного коэффициента примеси  $F$ , то есть:

$$S/N \geq F \cdot 10. \quad (3)$$

Если имеется несколько таких примесей, то:

$$S/N \geq F_{\max} \cdot 10, \quad (4)$$

где множитель  $F_{\max}$  – максимальное значение поправочного коэффициента для примесей, используемое в формуле для определения содержания примесей;  $F_{\max} = 1$ , если у всех примесей  $F \leq 1,25$ .

Отметим, что требования  $S/N \geq F \cdot 10$  и  $S/N \geq F_{\max} \cdot 10$  являются формальными, так как поправочный коэффициент зависит от отношения площадей, а не высот пиков [2], и при этом не учитывается увеличение высоты пика примеси, при прочих равных условиях, если пик примеси выходит до пика основного вещества. Тем не менее, *введение условия (3) или (4) в проверку пригодности (чувствительности) хроматографической системы снижает риск неправильной оценки содержания отдельных примесей и суммы примесей, а это очень важно на практике.*

**При наличии образцов примесей, удовлетворяющих второму индикатору,** для снижения риска недостаточной чувствительности хроматографической системы целесообразно использовать следующий подход. Готовят исходный раствор смеси примесей, у которых  $F > 1,25$ , с концентрацией примесей в 5 или более раз превышающей порог игнорирования примесей. Из этого раствора затем можно готовить растворы с меньшей концентрацией примесей путем взятия определенных аликвот. Инжектировать разбавленный раствор смеси примесей с концентрациями на уровне порога игнорирования примесей ( $C_N$ ; чаще всего 0,05% от концентрации испытуемого раствора для определения примесей). Если окажется, что у пиков этих примесей  $S/N \geq 3$ , то достаточно использовать требование  $S/N \geq 10$  для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС. В противном случае следует увеличить концентрацию примесей в растворе их смеси до такой ( $C_p$ ), при которой у пиков всех примесей будет  $S/N \geq 3$  и, соответственно, уточнить требование к отношению  $S/N$  для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС:

$$S/N \geq 10 (C_p/C_N), \quad (5)$$



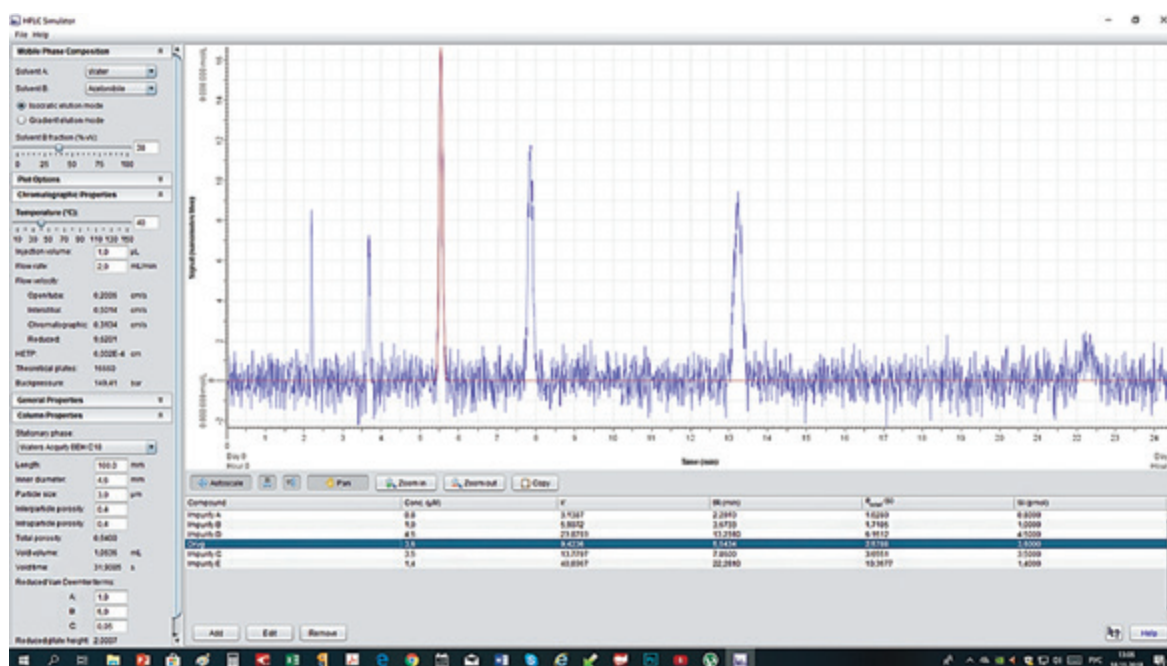


Рисунок 1. Исходная модельная хроматограмма раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (ПЧХС), дополненная для наглядности пиками 5 «примесей». Время удерживания (RT) основного вещества (пик красного цвета) около 5,5 мин,  $S/N \approx 10$ . Почти незаметен пик «примеси» с RT 22,3 мин на фоне шума базовой линии и у него  $S/N < 3$

Figure 1. Initial model chromatogram of the solution for checking the sensitivity of the chromatographic system (PCHS), supplemented for clarity with peaks of 5 «impurities». The retention time (RT) of the main substance (red peak) is about 5.5 min,  $S/N \approx 10$ . The «impurity» peak is almost imperceptible with a RT of 22.3 minutes against the background noise of the baseline and its  $S/N < 3$

где  $C_N$  – концентрация раствора смеси примесей с  $F > 1,25$  на уровне порога игнорирования примесей;  $C_F$  – минимальная концентрация аналогичного раствора, при которой у всех пиков примесей с  $F > 1,25$  отношение  $S/N \geq 3$ .

Для иллюстрации этого подхода на рисунках 1 и 2 приведены модельные хроматограммы раствора ПЧХС, на которых для наглядности добавлены пики 5 «примесей» помимо пика основного вещества. Эти хроматограммы получены с помощью компьютерной программы «HPLC Simulator 6.0» [12]. На хроматограмме исходного модельного раствора ПЧХС (рисунок 1) трудно заметить пик «примеси» с временем удерживания (RT) 22,3 мин<sup>1</sup>. При этом у пика основного вещества с RT 5,5 мин отношение сигнал/шум  $S/N \approx 10$ . Для того, чтобы пик «примеси» с RT 22,3 мин можно было достаточно надежно детектировать и обсчитывать, то есть для достижения  $S/N \approx 3$  (LOD), потребовалось увеличить концентрацию модельного раствора ПЧХС в 2,5 раза. В результате этого действия у пика «примеси» с RT 22,3 мин получили отношение  $S/N \approx 3$ , а у пика основного вещества с RT 5,5 мин  $S/N \approx 25$  (рисунок 2). То есть в аналогичном реальном случае требование к отношению сигнал/шум для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС  $S/N \geq 10$  было бы не-

достаточным для определения содержания всех примесей и его следовало заменить на  $S/N \geq 25$ .

Подчеркнем, что условие (5) дает возможность более надежно оценивать необходимую чувствительность хроматографической системы для методик определения примесей с поправочными коэффициентами  $F > 1,25$ , чем (3) и (4), так как оно основывается на реальном тестировании необходимой чувствительности хроматографической системы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье рассмотрены ситуации, при которых нижняя граница требования  $S/N \geq 10$ , то есть 10, может оказаться недостаточно большой для надежного детектирования пиков примесей. Показано как можно обнаружить такие ситуации и как при этом скорректировать концентрацию испытуемого раствора и/или требование к отношению  $S/N$  для пика основного вещества на хроматограмме раствора ПЧХС, чтобы обеспечить надежное определение примесей в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Эпштейн Н. А., Емшанова С. В. О требованиях к пригодности хроматографической системы при контроле качества лекарственных субстанций и препаратов методом ВЭЖХ. *Химико-фармацевтический журнал*. 2008; 42(11): 34–40.
2. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 7<sup>th</sup> Ed. European Pharmacopoeia. 2015.
3. United States Pharmacopoeia. USP40–NF35. 2017.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Москва. 2018; 1: 863.

<sup>1</sup> Программа «HPLC Simulator 6.0», как и другие компьютерные программы, моделирующие хроматограммы, не дает возможности вводить значение поправочного коэффициента  $F$ . Поэтому моделировали  $F$  путем уменьшения концентрации примеси с RT 22,3 мин по сравнению с концентрацией основного вещества.

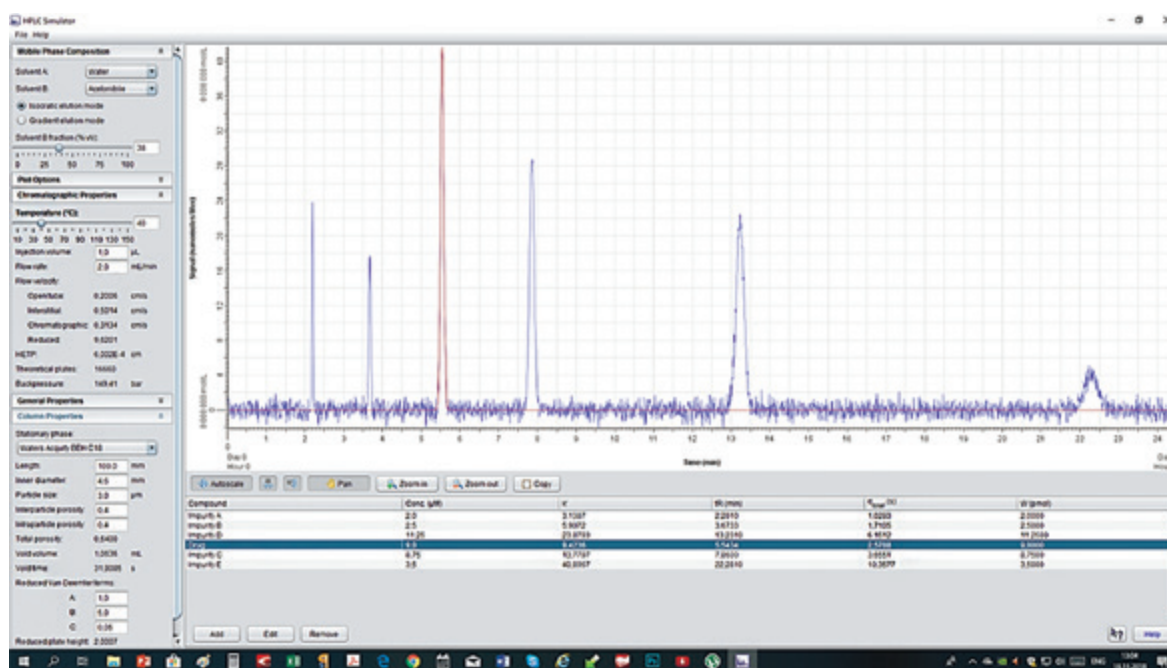


Рисунок 2. Хромотограмма раствора ПЧХС полученная путем увеличения концентрации исходного модельного раствора ПЧХС (рисунок 1) в 2,5 раза. При этом у «примеси» с RT 22,3 мин значение S/N≈3. У пика основного вещества с RT 5,5 мин значение S/N≈25

Figure 2. Chromatogram of the PCHA solution obtained by increasing the concentration of the initial model PCHA solution (Figure 1) 2.5 times. At the same time, the «impurity» with RT 22.3 min and the value S/N≈3. At the peak of the main substance with RT 5.5 min, the value of S/N≈25

- Эпштейн Н. А. О допустимых значениях порога игнорирования примесей и отношения сигнал/шум при проверке чувствительности хроматографической системы. *Ведомости НЦЭСМП*. 2017; 7(2): 85-91. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/318041495\\_ABOUT\\_ADMISSIBLE\\_VALUES\\_OF\\_DISREGARD\\_LIMITS\\_FOR\\_IMPURITIES\\_AND\\_SIGNAL-TO-NOISE\\_RATIO\\_WHEN\\_CHECKING\\_CHROMATOGRAPHIC\\_SYSTEM\\_SENSITIVITY\\_O\\_dopustimyh\\_znacheniah\\_poroga\\_ignorirovania\\_primesej\\_i\\_otnoshenia\\_s](https://www.researchgate.net/publication/318041495_ABOUT_ADMISSIBLE_VALUES_OF_DISREGARD_LIMITS_FOR_IMPURITIES_AND_SIGNAL-TO-NOISE_RATIO_WHEN_CHECKING_CHROMATOGRAPHIC_SYSTEM_SENSITIVITY_O_dopustimyh_znacheniah_poroga_ignorirovania_primesej_i_otnoshenia_s)
- Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L. *Practical HPLC Method Development*. 3<sup>rd</sup> ed. – New Jersey: J. Wiley. 2010.
- Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Washington. 1994.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). – ICH. 2005.
- Эрмер Й., Миллер Д. Х. МакБ. Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучших практик. – М.: ВИАЛЕК. 2013.
- Эпштейн Н. А. О стрессовых экспериментах при разработке / усовершенствовании аналитических методик и технологий лекарственных субстанций и препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016; 3(16): 54–68. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/309858541\\_ABOUT\\_STRESS\\_EXPERIMENTS\\_BY\\_DEVELOPING\\_IMPROVING\\_ANALYTICAL\\_METHODS\\_AND\\_TECHNOLOGY](https://www.researchgate.net/publication/309858541_ABOUT_STRESS_EXPERIMENTS_BY_DEVELOPING_IMPROVING_ANALYTICAL_METHODS_AND_TECHNOLOGY)
- Increase Waters 996 Photodiode Array Detector Sensitivity with Maxplot. Waters. 2000. Available at: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/wpp06.pdf>
- HPLC Simulator 6.0. Available at: <http://hplc-simulator.software.informer.com/6.0/>.
- Эпштейн Н. А. Совместимость лекарственных и вспомогательных веществ при разработке лекарственных форм. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018; 52(7): 50–60. Available at: <http://chem.folium.ru/index.php/chem/article/view/3993>.
- Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 7<sup>th</sup> Ed. European Pharmacopoeia. 2015.
- United States Pharmacopoeia. USP40–NF35. 2017.
- Russian Federation State Pharmacopoeia XIV ed. M., 2018; 2: 1004 (In Russ.).
- Epshtein N. A. About admissible values of disregard limits for impurities and signal-to-noise ratio when checking chromatographic system sensitivity. *The Bulletin of the Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017; 7(2): 85-91 (In Russ.). Available at: [https://www.researchgate.net/publication/318041495\\_ABOUT\\_ADMISSIBLE\\_VALUES\\_OF\\_DISREGARD\\_LIMITS\\_FOR\\_IMPURITIES\\_AND\\_SIGNAL-TO-NOISE\\_RATIO\\_WHEN\\_CHECKING\\_CHROMATOGRAPHIC\\_SYSTEM\\_SENSITIVITY\\_O\\_dopustimyh\\_znacheniah\\_poroga\\_ignorirovania\\_primesej\\_i\\_otnoshenia\\_s](https://www.researchgate.net/publication/318041495_ABOUT_ADMISSIBLE_VALUES_OF_DISREGARD_LIMITS_FOR_IMPURITIES_AND_SIGNAL-TO-NOISE_RATIO_WHEN_CHECKING_CHROMATOGRAPHIC_SYSTEM_SENSITIVITY_O_dopustimyh_znacheniah_poroga_ignorirovania_primesej_i_otnoshenia_s)
- Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L., *Practical HPLC Method Development*. 3<sup>rd</sup> ed. – New Jersey: J. Wiley. 2010.
- Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. – Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Washington. 1994.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). – ICH. 2005.
- Ermer Y., Miller, D. H. McB. Validation techniques in pharmaceutical analysis. Examples of best practices. – М.: VIALEK. 2013
- Epshtein N. A. About stress experiments by developing/improving analytical methods and technology of drug substances and medicines. *Drug Development & Registration*. 2016; 3(16): 54–68 (In Russ.). Available at: [https://www.researchgate.net/publication/309858541\\_ABOUT\\_STRESS\\_EXPERIMENTS\\_BY\\_DEVELOPING\\_IMPROVING\\_ANALYTICAL\\_METHODS\\_AND\\_TECHNOLOGY](https://www.researchgate.net/publication/309858541_ABOUT_STRESS_EXPERIMENTS_BY_DEVELOPING_IMPROVING_ANALYTICAL_METHODS_AND_TECHNOLOGY)
- Increase Waters 996 Photodiode Array Detector Sensitivity with Maxplot. Waters. 2000. Available at: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/wpp06.pdf>
- HPLC Simulator 6.0. Available at: <http://hplc-simulator.software.informer.com/6.0/>.
- Epshtein N. A. Compatibility between drugs and excipients when developing dosage forms. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018; 52(7): 50–60. Available at: <http://chem.folium.ru/index.php/chem/article/view/3993>.

## REFERENCES

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-113-117  
УДК 658.5

## СЕРТИФИКАЦИЯ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА ООО «ЦЕНТР ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ АНАЛИТИКИ» ПО ТРЕБОВАНИЯМ СТАНДАРТА ISO 9001:2015 (ГОСТ Р ИСО 9001-2015) (ОБЗОР)

А. А. Крылатова<sup>1\*</sup>, И. Е. Шохин<sup>1</sup>, Е. П. Образцова<sup>2</sup>

1 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

2 – Ассоциация по сертификации «Русский Регистр», 191014, Россия, г. Санкт-Петербург, Литейный проспект, д. 45/8, лит. А

\*Контактное лицо: Крылатова Анна А. E-mail: a.krylatova@cpha.ru

Статья получена: 09.01.2019. Статья принята к печати: 00.02.2019

### Резюме

**Введение.** В 2018 году ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» успешно прошел сертификацию системы менеджмента качества на предмет соответствия требованиям стандартов ISO 9001:2015 и ГОСТ Р ИСО 9001-2015 «Система менеджмента качества. Требования».

**Текст.** Сертификацию проводила Ассоциация по сертификации «Русский Регистр» – российская компания, которая является аккредитованным органом по сертификации систем менеджмента организаций. В данной статье описана программа сертификационного аудита «Русского Регистра», в которую входят: сертификация, состоящая из двух этапов, инспекционные проверки в течение первого и второго года и ре-сертификационный аудит в течение третьего года до момента окончания срока действия сертификата. В состав работ по подтверждению Сертификата соответствия «Русского Регистра» входят аудиты на местах, призванные оценить степень соблюдения организацией установленных требований стандарта, на соответствие которому была проведена сертификация [1]. Целями сертификационного аудита являлись: проверка соответствия системы менеджмента требованиям ISO 9001:2015 (ГОСТ Р ИСО 9001-2015), проверка установленных процессов и документации системы менеджмента организации; оценка способности системы менеджмента обеспечивать соответствие применимым законодательным, нормативным и контрактным требованиям; оценка результативности системы менеджмента для обеспечения уверенности, что поставленные цели могут быть достигнуты; идентификация областей для возможного улучшения системы менеджмента. Проверка проводилась по процессам и подразделениям, связанным с деятельностью организации, в течение двух дней. По результатам аудита была подтверждена область сертификации в отношении: научно-исследовательской работы, проведения биоаналитических исследований, проведения фармакокинетических исследований, проведения СТР (сравнительного текста кинетики растворения). Объем проверки включал проверку адекватности, соответствия деятельности и элементов системы менеджмента, в том числе: производственных, управленческих и вспомогательных процессов; политики; целей; организационной структуры управления; документации системы менеджмента, анализ мероприятий, предпринятых организацией для устранения проблемных областей, идентифицированных на 1 этапе сертификации [2].

**Заключение.** В сентябре 2018 года аналитическому центру были выданы сертификаты соответствия требованиям стандарта ГОСТ Р ИСО 9001:2015 в системе Ассоциации по сертификации «Русский Регистр» с аккредитацией Федеральной службы по аккредитации РФ (Росаккредитации); международного стандарта ISO 9001:2015 в системе Сертификации Русского Регистра, участника международного форума по аккредитации IAF; сертификат соответствия единого образца IQNet.

**Ключевые слова:** ГОСТ Р ИСО 9001-2015 «Система менеджмента качества. Требования», ISO 9001:2015, ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», Ассоциация по сертификации «Русский Регистр».

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Для цитирования:** Крылатова А. А., Шохин И. Е., Образцова Е. П. Сертификация системы менеджмента качества ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» по требованиям стандарта ISO 9001:2015 (ГОСТ Р ИСО 9001-2015). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 113–117.

## CERTIFICATION OF QUALITY MANAGEMENT SYSTEM OF LLC «CENTER OF PHARMACEUTICAL ANALYTICS» ACCORDING TO THE REQUIREMENTS OF ISO 9001:2015 (GOST R ISO 9001-2015) (REVIEW)

А. А. Krylatova<sup>1\*</sup>, I. E. Shohin<sup>1</sup>, E. P. Obrazcova<sup>2</sup>

1 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

2 – Certification Association «Russian Register», 45/8A, Liteyny prospect, Saint-Petersburg, 191014, Russia

\*Corresponding author: Anna A. Krylatova. E-mail: a.krylatova@cpha.ru

Received: 09.01.2018. Accepted: 00.02.2019

### Abstract

**Introduction.** In 2018 «Center of Pharmaceutical Analytics» LLC successfully passed the certification of quality management system for compliance with the requirements of ISO 9001: 2015 and GOST R ISO 9001-2015 «Quality Management System. Requirements».

**Text.** Certification was conducted by the Certification Association «Russian Register» – a Russian company, which is an accredited body for certification of management systems of organizations. This article describes the program of certification audit of the «Russian Register», which includes: certification, consisting of two stages, inspection checks during the first and second year and re-certification audit during the third year before the expiration of the certificate. The structure of works on confirmation of the certificate of conformity of «Russian Register» includes field audits designed to assess the degree of compliance of the organization with the established requirements of the standard for compliance with which certification was carried out [1]. The objectives of the certification audit were: verification of compliance of the management system with the requirements of ISO 9001: 2015 (GOST R ISO 9001-2015), verification of established processes and documentation of the management system of the organization; assessment of the ability of the management system to ensure compliance with applicable legislative, regulatory and contractual requirements; assessment of the effectiveness of the management system to ensure that the goals can be achieved; identification of areas for possible improvement of the management system. The audit was conducted over two days on processes and units related to the activities of the organization. The audit confirmed the scope of certification in respect of: research work, bioanalytical studies, pharmacokinetic studies, SPCR (comparative text of dissolution kinetics).



The scope of the audit included verification of adequacy, compliance of activities and elements of the management system, including: production, management and support processes; policies; goals; organizational structure of management; documentation of management system, analysis of measures taken by the organization to eliminate the problem areas identified at the 1st stage of certification [2].

**Conclusion.** In September 2018, the analytical center was issued certificates of compliance with the requirements of GOST R ISO 9001:2015 in the certification Association «Russian Register» with the accreditation of the Federal service for accreditation of the Russian Federation (Rosaccreditation); international standard ISO 9001: 2015 in the Certification system of the Russian Register, a member of the international forum on accreditation IAF; certificate of conformity.

**Keywords:** GOST R ISO 9001-2015 «Quality Management System. Requirements», ISO 9001:2015, LLC «Center of Pharmaceutical Analytics», Certification Association «Russian Register».

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**For citation:** Krylatova A. A., Shohin I. E., Obrazcova E. P. Certification of quality management system of LLC «Center of Pharmaceutical Analytics» according to the requirements of ISO 9001:2015 (GOST R ISO 9001-2015). *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 113–117.

## ВВЕДЕНИЕ

ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») – лабораторный центр, выполняющий высококачественные исследования в области разработки и контроля инновационных и воспроизведенных лекарственных средств. В 2016 году система менеджмента качества лабораторного центра была сертифицирована по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) в системе Сертификации Русского Регистра [Свидетельство Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)]. В 2017 и 2018 годах ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» успешно прошел плановые ежегодные надзорные аудиты с целью подтверждения соответствия ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». В 2018 году руководством компании было принято решение о сертификации системы менеджмента качества на предмет соответствия требованиям стандартов ISO 9001:2015 и ГОСТ Р ИСО 9001-2015 «Система менеджмента качества. Требования».

## ПОДГОТОВКА К СЕРТИФИКАЦИИ ЦЕНТРА

Внедрение системы менеджмента качества (СМК) является для организации стратегическим решением, которое может помочь улучшить показатели ее деятельности и создать надежную основу для инициатив по ее устойчивому развитию. В процессе подготовки к предстоящей сертификации руководством организации и отделом контроля качества была подготовлена следующая документация в рамках стандарта ГОСТ Р ИСО 9001-2015:

- руководство по качеству;
- политика в области качества;
- условия, в которых функционирует организация (матрица SWOT-анализа);
- программа мероприятий по улучшению деятельности организации;
- методы управления рисками;
- анализ понимания ожиданий и потребностей стейкхолдеров (заинтересованных сторон) и стратегия взаимодействия;

- идентификация процессов СМК;
- цели компании в области качества на 2018 год;
- карты основного, управляющего и поддерживающего процессов организации.

Для персонала организации были проведены соответствующие тренинги по требованиям стандарта ГОСТ Р ИСО 9001-2015. Проведен детальный анализ СМК со стороны руководства для оценки соответствия требованиям стандарта (в частности, разделам 4–10); идентификации возможных решений и действий, относящихся: к возможностям для улучшения, ко всем необходимым изменениям СМК и к потребностям в ресурсах. Результаты анализа обсуждались на совещании и были оформлены в виде отчета, который содержал:

- перечень рассматриваемых вопросов;
- заключения по каждому вопросу;
- оценку реализации политики лаборатории в области качества и ее соответствие политике и стратегии организации;
- оценку результативности системы менеджмента лаборатории и предложения по ее улучшению.

По результатам анализа был разработан план корректирующих и предупреждающих действий, определены ответственные исполнители и сроки устранения.

## ЭТАПЫ СЕРТИФИКАЦИИ

Сертификация системы менеджмента (СМ) начинается с подачи заявки на сертификацию. После получения заявки Центральный офис Русского Регистра направляет ответ о результатах рассмотрения. Если решение положительное, заключается договор на оказание услуг по сертификации. Сертификация СМ проводится в два этапа.

*Первый этап сертификации* системы менеджмента производится аудиторами Русского Регистра с целью определения готовности организации к сертификации [1]. Организация должна подтвердить приверженность принципам ISO 9001:2015:

1. *Ориентация на потребителя* (основные усилия менеджмента качества сфокусированы на выполнении требований потребителей и стремлении превзойти его ожидания).
  2. *Лидерство* (лидеры на всех уровнях организации обеспечивают единство намерений и направлений деятельности и создают условия, в которых люди вовлечены в достижение целей организации в области качества).
  3. *Вовлечение людей* (компетентные, наделенные полномочиями и вовлеченные сотрудники на всех уровнях организации крайне важны для достижения целей).
  4. *Процессный подход* (последовательно получаемые и предсказуемые результаты достигаются более результативно и эффективно, когда деятельность рассматривают как совокупность взаимосвязанных процессов, которые функционируют как связанная система).
  5. *Улучшение* (успешные организации постоянно нацелены на улучшение).
  6. *Принятие решений на основе свидетельств* (решения, основанные на анализе и оценке данных и информации, более вероятно приводят к желаемым результатам).
  7. *Менеджмент взаимоотношений* (для достижения устойчивых успехов организации управляют своими взаимоотношениями с соответствующими заинтересованными сторонами, такими как поставщики).
- Аудиторами проверяется комплекс ключевых требований к организационной структуре, процедурам, процессам и ресурсам системы менеджмента. Пример плана 1 этапа сертификации системы менеджмента качества ООО «ЦФА» приведен в таблице 1.

Целью *второго этапа* является определение соответствия системы менеджмента организации, её процессов и рабочих мест всем применимым требованиям заявленного стандарта и собственным внутренним документам, оценка результативности системы менеджмента и ее способности достигать установленных целей в рамках реализации политики, оценка степени выполнения организацией обязательных законодательных и других регламентирующих требований, относящихся к оказываемым услугам [1]. В ходе аудита персонал организации отвечает на вопросы, описывает порядок действий в течение рабочего дня или конкретного исследования, демонстрирует знания политики и целей организации в области качества, должностных инструкций и другой документированной информации.

При положительных результатах аудита, сертификационный орган принимает решение о *выдаче сертификата*. Сертификат соответствия действителен в течение трех лет при условии его подтверждения во время инспекционных проверок. Система менеджмента качества ООО «ЦФА» была сертифицирована по стандартам: ISO 9001:2015 «Quality management

systems. Requirements.» с аккредитацией Голландского совета по аккредитации RvA, члена Международного аккредитационного форума IAF<sup>1</sup>.

Таблица 1. План первого этапа сертификации СМК

Table 1. Plan of the first stage of QMS certification

| Мероприятие                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Объект проверки: (процесс/элемент)                   | Пункт стандарта ISO 9001:2015                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>Вступительное совещание</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                      |                                                                      |
| Встреча с руководством предприятия                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Лидерство и приверженность                           | 4                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Политика в области качества                          | 5                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Процессный подход                                    | 6                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Функции, ответственность и полномочия в организации  | 7                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Контекст организации                                 | 8                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Ориентация на потребителей                           | 9                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Действия в отношении рисков и возможностей           | 10                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Цели в области качества и планирование их достижения |                                                                      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Ресурсы Организации                                  |                                                                      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Планирование изменений                               |                                                                      |
| Проверка адекватности                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Документация СМК                                     | 4–10                                                                 |
| Ознакомительный осмотр производственных участков предприятия и условий производства. Фиксация мест (объектов) на которые будет рекомендовано обратить повышенное внимание при проведении 2-го этапа сертификации                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                      |                                                                      |
| Уточнение области сертификации (в том числе наличие филиалов, наличие процессов аутсорсинга, наличие и правомочность исключений).<br>Выполнение законодательных требований.<br>Процессы, продукция и услуги, поставляемые внешними поставщиками.<br>Заинтересованные стороны                                                                                                                                                                                                                                |                                                      | 4–10<br>4.3                                                          |
| Оценка выполнения требований заявленного стандарта:<br>Планирование и управление деятельностью на стадиях жизненного цикла продукции и услуг<br>Документированная информация<br>Процессный подход<br>Мониторинг процессов<br>Планирование, Цели и задачи<br>Ответственность, полномочия<br>Знания организации<br>Оценка результатов деятельности<br>Внутренний аудит<br>Анализ со стороны руководства<br>Постоянное улучшение<br>Оценка степени внедрения СМ (в том числе беседа с персоналом организации). |                                                      | 4<br>8<br>4.4<br>6.2<br>5.3<br>6.1<br>8.1<br>8.5<br>9.1<br>9.3<br>10 |
| Перерыв                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                      |                                                                      |
| Планирование проведения 2-ого этапа сертификации                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                      |                                                                      |
| Подведение итогов                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                      |                                                                      |

<sup>1</sup> IAF – Международный форум по аккредитации (IAF) является всемирной ассоциацией органов по аккредитации, ассоциаций органов по сертификации и других организаций, принимающих участие в деятельности по оценке соответствия в различных областях, в том числе систем менеджмента, продукции и персонала. IAF способствует всемирному признанию сертификатов соответствия, которые были выданы органами по сертификации, аккредитованными подписантом IAF MLA.



Рисунок 1. Сертификат соответствия требованиям стандарта ISO 9001:2015 «Quality management systems. Requirements»

Figure 1. Certificate of compliance with the requirements of ISO 9001: 2015 Standard «Quality management systems. Requirements»

ГОСТ Р ИСО 9001–2015 «Системы менеджмента качества. Требования» [3] с аккредитацией Росаккредитации<sup>1</sup>, действующей в рамках Федерального закона РФ от 28.12.2013 № 412-ФЗ «Об аккредитации в национальной системе аккредитации». Согласно данному федеральному закону, легитимность и признание Сертификатов соответствия на территории РФ обеспечивается наличием у органа по сертификации аккредитации Федеральной службы по аккредитации РФ (Росаккредитации). Данная национальная аккредитация распространяется на сертификацию по стандартам в области менеджмента, сертификацию продукции и персонала).

Помимо Сертификата соответствия в системе Русского Регистра, лабораторному центру был выдан Сертификат соответствия единого образца IQNet<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Русский Регистр имеет официальную аккредитацию Федеральной службы по аккредитации РФ (Росаккредитация).

<sup>2</sup> IQNet – Международная ассоциация органов по сертификации. Система сертификации IQNet создана с целью обеспечения клиентов членов IQNet – 34 ведущих органов по сертификации из 32 стран мира, максимально возможным признанием на глобальных рынках.



Рисунок 2. Сертификат соответствия требованиям стандарта ГОСТ Р ИСО 9001-2015 «Системы менеджмента качества. Требования»

Figure 2. Certificate of compliance with the requirements of GOST R ISO 9001-2015 «Quality management systems. Requirements»

Целью инспекционных проверок является установление факта поддержания организацией системы менеджмента в действии, выполнения положения о непрерывном улучшении, оценка результативности системы менеджмента и определение соответствия деятельности заявленному стандарту и требованиям к системе менеджмента. Инспекционный контроль проводится не реже одного раза в календарный год.

## РЕСЕРТИФИКАЦИЯ

Для прохождения ресертификации необходимо подать заявку на ресертификацию в Центральный офис Русского Регистра. Ресертификационный аудит проводится для оценки того, что организация продолжает выполнять все требования соответствующего стандарта системы менеджмента. Ресертификационный аудит призван подтвердить, соответствие и результативность системы менеджмента исходя из заявленной области сертификации. После прохождения аудита и принятия положительного решения оформляется сертификат соответствия на следующий трехлетний цикл [1].





Рисунок 3. Сертификат соответствия единого образца IQNet  
Figure 3. The certificate of conformity of a single sample IQNet

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процедура поэтапной сертификации позволяет организации устранить выявленные несоответствия в ходе первого этапа проверки и успешно пройти аудит, итогом которого является получение сертификата. Наличие сертификата соответствия системы менеджмента качества требованиям стандарта ГОСТ Р ИСО 9001-2015 «Системы менеджмента качества. Требования» позволило компании ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» выйти на качественно новый уровень оказания услуг.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ассоциация по сертификации «Русский Регистр». Available at: <https://rusregister.ru/> (accessed 28.12.2018).
2. Центр фармацевтической аналитики. Available at: <http://cpa.ru/> (accessed 28.12.2018).
3. ГОСТ Р ИСО 9001-2015 «Система менеджмента качества. Требования».
4. ISO 9001:2015 «Quality management systems – Requirements».

## REFERENCES

1. Certification Association «Russian Register». Available at: <https://rusregister.ru/> (accessed 28.12.2018).
2. Center of Pharmaceutical Analytics. Available at: <http://cpa.ru/> (accessed 28.12.2018).
3. GOST R ISO 9001-2015 «Quality Management System. Requirements».
4. ISO 9001:2015 «Quality management systems – Requirements».



# PHARMA<sup>ASI</sup>

ЮБИЛЕЙНЫЙ  
25-Й РОССИЙСКИЙ  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ  
ФОРУМ

## РОССИЙСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ

**14–15 мая 2019**

Отель «Коринтия Санкт-Петербург»

[www.russianpharma.com](http://www.russianpharma.com)



**Крупнейшее мероприятие для руководителей  
международных и российских производителей,  
дистрибуторов и розничных сетей**



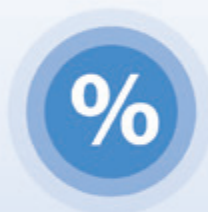
**600+**  
делегатов



**100+**  
докладчиков



**60+**  
обсуждений



Для получения  
скидки 10%  
используйте VIP-код

**1177MRHJ**



Свяжитесь с **Ребеккой Пикеринг**  
по электронной почте  
[rebecca@adamsmithconferences.com](mailto:rebecca@adamsmithconferences.com)  
или по телефону +442080045703  
для обсуждения спонсорских возможностей



## ДОПИНГ В СПОРТЕ И ЖИЗНИ

Адрес всех авторов: ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2  
Контактное лицо: Белова Мария Владимировна. E-mail: manielabel@gmail.com

### Резюме

Настоящий материал представляет собой несколько основных и наиболее интересных докладов, прозвучавших на научной конференции студентов старших курсов Института фармации Сеченовского университета на тему «Допинг в спорте и жизни».

В современном мире спортивным победам придается большое значение, не только спортивное, но и политическое. Спортсмены подвергаются физическим и психоэмоциональным нагрузкам, часто превышающим адаптационные возможности организма, и требующим «искусственного» подкрепления с помощью допинговых средств и методов. Проблема применения допинга в спорте является одной из острейших и актуальных, о чем свидетельствуют допинговые скандалы последнего времени. Другая сторона этого вопроса – модное в современном мире увлечение здоровым образом жизни, желание быть сильным и не стареть, что часто провоцирует самостоятельное использование различных средств и приемов, квалифицируемых как допинг, без необходимых медицинских рекомендаций и контроля. В предлагаемых вашему вниманию докладах рассмотрены история применения допинга и антидопингового движения, основные виды допинговых средств, негативные последствия их приема, методы допингового контроля, а также возможность фальсификации его результатов. Авторы высказывают свое видение проблем применения современных видов допинга в спорте и жизни и борьбы с этим явлением.

Обсуждение и медицинская оценка этих вопросов безусловно вызовет интерес достаточно широкой аудитории.

**Ключевые слова:** допинг, допинг – контроль, анаболические стероиды, стимуляторы ЦНС, кровяной допинг, генный допинг, фальсификация допингового контроля.

## DOPING IN SPORT AND LIFE

Address of all authors: Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

Corresponding author: Maria V. Belova. E-mail: manielabel@gmail.com

### Abstract

This material is a few of the main and most interesting reports made at the scientific conference of senior students of the Institute of pharmacy of Sechenov University on «Doping in sport and life».

In the modern world, sports victories are given great importance, not only sports, but also political. Athletes are subjected to physical and psycho-emotional stress, often exceeding the adaptive capacity of the body, and require "artificial" reinforcement with doping tools and methods. The problem of doping in sports is one of the most acute and urgent, as evidenced by the doping scandals of recent times. The other side of this issue – fashionable in the modern world passion for a healthy lifestyle, the desire to be strong and not to grow old, which often provokes the independent use of various means and techniques, qualified as doping, without the necessary medical advice and control. In the reports offered to your attention the history of doping and anti-doping movement, the main types of doping means, the negative consequences of their use, methods of doping control, as well as the possibility of falsification of its results. The authors express their vision of the problems of the use of modern types of doping in sports and life and fight against this phenomenon.

Discussion and medical assessment of these issues will certainly be of interest to a fairly wide audience.

**Keywords:** doping, doping control, anabolic steroids, CNS stimulants, blood doping, gene doping, falsification of doping control.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время спортивным победам принято придавать большое значение, не только как достижениям человеческого духа и силы, но как политическим и социальным явлениям. Спортивные рекорды повышают престиж страны – родины победителей. Это приводит к тому, что спортсмены подвергаются высоким физическим и психоэмоциональным нагрузкам, порой превышающим адаптационные возможности человека. Поэтому и спортсмены, и специалисты смежных областей биологии и медицины помимо совершенствования тренировочного процесса и материальной составляющей спорта изыскивают всевозможные, порой неблагоприятные, способы для победы в спортивных состязаниях любой ценой. Один из таких способов – использование лекарственных средств, пищевых добавок в повышенных дозировках, и специальных

методов для повышения работоспособности и выносливости, что наносит вред организму спортсмена и нарушает принципы честной спортивной борьбы. Такие вещества и методы классифицируются как допинг. Есть и другая сторона вопроса: как показывает практика – увлечение здоровым образом жизни, желание быть сильным и не стареть часто провоцирует использование различных средств, называемых в спорте допингом, без необходимых медицинских рекомендаций и контроля.

Агрессивная реклама различных биологически активных добавок для улучшения физических данных, дилетантский подход к использованию различных процедур и диет, может привести к серьезным нарушениям здоровья. Этим вопросы обсуждались на научной конференции студентов старших курсов, прошедшей в мае 2018 года в Институте фармации Сеченовского университета.



## ДОПИНГ: С ДРЕВНЕЙШИХ ВРЕМЕН ДО НАШИХ ДНЕЙ

**Ю. А. Шин, О. И. Перец, А. Р. Сайфутдинова,  
Г. М. Родионова, Ю. А. Тихонова**

### DOPING: FROM ANCIENT TIMES TO THE PRESENT DAY

**Yu. A. Shin, O. I. Perets, A. R. Saifutdinova,  
G. M. Rodionova, Yu. A. Tikhonova**

Слово «DOPING» было привнесено в английский язык из Юго-Восточной Африки. DOP – это крепкий возбуждающий и дурманирующий напиток, который кафры применяли перед религиозными обрядами. В английских словарях «DOPING» появился в 1889 году и означал смесь опиума с наркотиками, которую давали скаковым лошадям и гончим собакам перед забегами.

С появлением Олимпийских игр (Первые Олимпийские игры были проведены в 776 г. до н.э.) их участники пили специальные настои трав в вине, принимали галлюциногены, а также ели много мяса, полагая, что содержащиеся в нем компоненты придают небывалую силу, мощь и выносливость спортсмену. Запреты касались только предварительной договоренности о результатах соревнований и игр в поддавки.

В I веке римские гладиаторы тоже не брезговали галлюциногенами и употребляли стрихнин, который в малых дозах оказывает стимулирующий эффект на ЦНС, возбуждает сосудодвигательный и дыхательные центры мозга, а также тонизирует скелетную мускулатуру и сердечную мышцу. Допинга не избежали даже лошади, принимавшие участие в гонках колесниц: их поили слабоалкогольным медом, чтобы они бежали еще быстрее. Профессор американского биотехнического исследовательского института The Hastings Center Томас Марри в статье «Принудительная сила наркотиков в спорте» писал, что современное применение стимулирующих препаратов в спорте началось с конца 19 века. В это время в Европе и Америке получил широкое распространение напиток из вина Бордо с листьями коки, называемый «вино Мариани» или «вино для атлетов».

1865 год отмечен первыми документированными упоминаниями об употреблении допинга на соревнованиях по плаванию в Амстердаме. В 1886 году опубликовано первое сообщение о смерти спортсмена вследствие употребления допинга. Известный британский велогонщик Артур Линтон выиграл однодневную велогонку Бордо-Париж (600 км) и через шесть недель умер в возрасте 28 лет из-за употребления на гонке «бодрящего» коктейля из стрихнина и героина.

В 1928 году Международная Ассоциация Легкоатлетических Федераций вводит запрет на допинг, но тесты на применение допинга еще не проводились. 1935 год ознаменовал начало эры анаболических стероидов. В Германии получен синтетический тестостерон. В 1936 году на Олимпийских играх в Берлине не-

мецкие атлеты принимали стероидные препараты и как результат превзошли всех.

Период 1945-1967 годов характеризует два процесса: рост употребления допинга в спорте и расширение антидопинговых мер. Первыми эффективными допингами стали препараты класса амфетаминов, сильнейшие стимуляторы нервной системы, которыми армии США, Британии, а также Германии и Японии снабжали своих солдат во время Второй Мировой войны. В 50-е годы их употребление мигрировало в спорт. В 1958 году американский врач Джон В. Зиглер разработал первый анаболический стероид, получивший название «Дианабол». После ряда испытаний тестостерона на спортсменах и выявления его побочных действий Зиглер задался целью синтезировать вещество, которое бы оказывало такое же положительное анаболическое действие на белковый и жировой обмен, как и тестостерон, но не имело бы побочных эффектов. Так появился первый анаболический стероид, применение которого было одобрено FDA. В начале 1960-х годов синтетические анаболики получили распространение в американском спорте. В большом количестве публикаций препараты этого класса рекомендовали спортсменам, специализирующимся в силовых и скоростно-силовых видах спорта – тяжелой атлетике, бодибилдинге и др. Но уже в 1975 году МОК введет полный запрет на применение анаболических стероидов.

Знаменательное событие в истории допинга произошло на Международном конгрессе по спортивной медицине, проходившем в 1965 г. в Страсбурге. Было дано определение допингу – это введение в организм человека любым путем вещества, чуждого этому организму, или какой-либо физиологической субстанции в ненормальном количестве, или введение какого-либо вещества неестественным путем, для того, чтобы искусственно и нечестным путем повысить результат спортсмена во время выступления в соревнованиях. В 1967 году зафиксирована допинговая смерть Тома Симпсона на «Тур-де-Франс». В этот же год произошло утверждение первого списка запрещенных препаратов. В 1968 году были проведены первые проверки на допинг на Олимпийских играх.

В 1972 году начались массовые проверки олимпийских спортсменов на наркотики и стимуляторы. В 1974 году впервые разработан метод определения стероидов в моче. Довольно сложной, с точки зрения обнаружения фактов применения, оказалась проблема контроля на кровяной допинг (гемотрансфузии, аутогемотрансфузии), использование которого получило распространение начиная с 1970-х годов в видах спорта, связанных с проявлением выносливости к длительной работе. В 1986 году МОК ввел запрет на кровяной допинг во всех его возможных вариациях.

В начале 1980-х годов Медицинская комиссия МОК столкнулась с проблемой использования спортсменами новых классов препаратов, таких как бета-адреноблокаторы и диуретики. В 1989 году Советом Европы бы-

ла принята Конвенция против применения допинга в спорте, а через 10 лет создана Всемирное антидопинговое агентство WADA (World Anti-doping Agency). 20 февраля 2003 года был принят Всемирный антидопинговый кодекс WADA. В этом же году было выявлено применение «неуловимого допинга», анаболического стероида тетрагидрогестринона (THG).

WADA – международная независимая организация, финансируемая Международным олимпийским комитетом (МОК), созданная для борьбы с применением допинга в спорте. Совет учредителей WADA включает в себя не более 40 членов, назначаемых сроком на три года, которые могут быть переизбраны на неограниченное число сроков. Роль WADA заключается в мониторинге соблюдения кодекса подписавшими его сторонами и утверждении международных стандартов. Работа агентства регламентируется несколькими документами:

1. Всемирным анти-допинговым кодексом.
2. Международными стандартами для тестирования.
3. Лабораторией терапевтических исключений.
4. Списком запрещенных препаратов.

На 1 января каждого года WADA публикует новую версию списка запрещенных препаратов – это международный стандарт, определяющий какие субстанции и методы запрещены в спорте. Новая версия публикуется за три месяца до вступления списка в силу.

Список состоит из трех частей:

1. Субстанции и методы, запрещенные в спорте постоянно (как в соревновательный, так и во внесоревновательный периоды).
2. Субстанции и методы, запрещенные только на соревнованиях.
3. Субстанции, запрещенные в отдельных видах спорта.

На 1 января 2018 года произошли некоторые изменения в списке запрещенных препаратов:

1. Разрешены алкоголь и синтетический каннабидиол.
2. До 2018 года были запрещены соли кобальта и кобальт – содержащие витамины, теперь стали запрещены только соли кобальта.
3. Выяснилось, что глицерин минимально влияет на объем плазмы крови, поэтому его удалили из запрещенного списка.
4. Мельдоний по-прежнему запрещен.

В нашей стране был принят Федеральный закон «О физической культуре и спорте в Российской Федерации» от 04.12.2007 № 329-ФЗ, регулирующий и контролирующий возникающие отношения при деятельности в сфере физкультуры и спорта. Закон содержит две статьи:

1. О предотвращении допинга в спорте.
2. Положения об общероссийской антидопинговой организации.

Полное и всемирное соблюдение антидопинговых правил невозможно без тщательного допингового контроля. Поскольку от результатов допинг-контроля зависит спортивная карьера, а часто и судьба спорт-

смена, все процедуры для его осуществления строго регламентированы законодательством WADA.

Большое значение для адекватной оценки применения допинга имеет выбор объекта исследования и правила забора объектов. Такими объектами являются в первую очередь моча, кровь, а также выдыхаемый воздух, слюна, пот, волосы, ногти.

Отбор проб является строго регламентированным и ответственным участком в системе антидопинговых мероприятий. При отборе проб во избежание осложнений и ошибок при принятии решений и санкций за употребление допинга должно быть обеспечено однозначное соответствие конкретной пробы и конкретного спортсмена, исключена возможность подмены или фальсификации проб, обеспечены безопасные условия хранения, транспортировки и документации образцов.

Пробы для допинг-контроля должны анализироваться только в лабораториях, аккредитованных WADA, к которым предъявляются достаточно жестко регламентируемые методы. Качество работы лаборатории контролируется периодическим направлением неизвестных контрольных проб среди прочих присылаемых на анализ проб спортсменов.

При проведении допинг-контроля используется комплекс химических, биологических и физико-химических методов. Проводится многоэтапное исследование, предусматривающее сочетание методов с различной степенью чувствительности, селективности, с целью получения максимально полной и достоверной информации о пробе.

В 2016 году The NewYorkTimes опубликовал заявление бывшего директора Российского Антидопингового центра, Г. Родченкова, о разработанной им схеме приема допинга, благодаря которой российские спортсмены показали такие блестящие результаты на зимней Олимпиаде – 2014, и о том, что это осуществлялось в рамках государственной политики в области спорта. По его словам, он лично участвовал в подмене позитивных допинг-проб А и В в Сочи, при этом в подмене участвовали и сотрудники ФСБ. На основании заявления Г. Родченкова и доклада Макларена МОК признал 43 российских спортсмена, участвовавших в Играх в Сочи, виновными в нарушении антидопинговых правил, аннулировал их результаты на Олимпиаде – 2014 и пожизненно отстранил от участия в Играх.

В апреле 2018 года бывший глава Антидопингового центра Г. Родченков, и глава независимой комиссии WADA Р. Макларен, начали отрицать, что обвиняли российских спортсменов в допинге.

Мельдоний был добавлен к списку WADA в 2016 году. WADA относит его к гормонам и модуляторам метаболизма. Сам препарат был разработан в СССР латвийским ученым Иварсом Калвиньшом в 1975 году и является ингибитором окисления жирных кислот (препятствует их сжиганию). Мельдоний применяется исключительно в странах СНГ, на Западе он не распространен. Препарат показан для комплексной терапии при ишемии, но также применяется для повышения

работоспособности, уменьшения симптомов психического и физического перенапряжения.

Наиболее известными российским спортсменами, обвиненными в применении мельдония, являются: Мария Шарапова, Юлия Ефимова, Александр Крушил-ницкий и другие.

Подводя итог, еще раз следует подчеркнуть, что современные способы повышения работоспособности и лекарственные препараты, используемые в медицине, могут быть вредны при неумелом или неконтролируемом использовании и могут стать причиной нарушения здоровья спортсмена и нечестной спортивной борьбы, не соответствующей духу Олимпийского движения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Платонов В. Н., Олейник С. А., Гунина Л. М. Допинг в спорте и проблемы фармакологического обеспечения подготовки спортсменов. М.: *Советский спорт*. 2010.
2. Процедурные правила допинг-контроля. М.: *Терра-Спорт, Олимпия Пресс*. 2002.
3. Горчакова Н. А., Гудивок Я. С., Гунина Л. М. и др. Фармакология спорта. Под общ. ред. Олейника С. А., Гуниной Л. М., Сейфуллы Р. Д. – К.: *Олимп. литература*. 2010.
4. Семенов В. А. Спорт и допинг. В сб.: Материалы семинара-совещания представителей НОК стран СНГ и Балтии; 16 июня 2005. Алма-Ата. М.: *Физкультура и спорт*. 2005; 32–38.
5. Гик Е., Гупало Е. Спорт и допинг. *Наука и жизнь*. 2008; 1.
6. Допинговый скандал, приведший к недопуску российской сборной на Олимпиаду. Досье. Available at: <https://tass.ru/info/4942094>.

## REFERENCES

1. Platonov V. N., Oleinik S. A., Gunina L. M. Doping in sport and the problems of pharmacological support for training athletes. M.: Soviet sport. 2010 (In Russ.).
2. Doping Control Procedure Rules. M.: *Terra-Sport Olympia Press*. 2002.
3. Gorchakova N. A., Gudivok Ya. S., Gunina L. M. et al. Pharmacology of sport. Under total ed. Oleynik S. A., Gunina L. M., Seyfulla R. D. – K.: *Olympus literature*. 2010. (In Russ.).
4. Semenov V. A. Sport and dope. In Sat: Materials of the seminar-meeting of representatives of NOCs of the CIS and Baltic countries; June 16, 2005. Alma-Ata. M.: *Physical culture and sport*. 2005; 32–38 (In Russ.).
5. Gik E., Gupalo E. Sport and dope. *Science and life*. 2008; 1. (In Russ.).
6. The doping scandal that led to the non-admission of the Russian team to the Olympics. Dossier. Available at: <https://tass.ru/info/4942094>.

## АНАБОЛИЧЕСКИЕ СТЕРОИДЫ – НАИБОЛЕЕ ПОПУЛЯРНЫЙ ВИД ДОПИНГОВЫХ СРЕДСТВ

**И. В. Акимов, В. В. Булыгина, Е. А. Волкова,  
О. И. Передеряев**

## ANABOLIC STEROIDS – MOST POPULAR TYPE OF DOPING PRODUCTS

**I. V. Akimov, V. V. Bulygina, E. A. Volkova,  
O. I. Perederaev**

В группу стероидов входят природные и синтетические химические вещества – производные циклопентанпергидрофенантрена. По химическому строению и биологическому эффекту их классифицируют на:

- производные эстрогена – женские половые гормоны эстроген и прогестерон, определяющие развитие вторичных половых признаков у женщин и способствующие функционированию органов женской репродуктивной системы;
- производные андростана – мужские половые гормоны андрогены, один из которых – тестостерон – определяет развитие вторичных половых признаков у мужчин, способствует функционированию органов мужской репродуктивной системы;
- производные прегнана – гестагенные гормоны и кортикостероиды.

Анаболическими стероидами (АС) называют класс препаратов, которые по химической структуре и фармакологическому действию близки к тестостерону, являются его производными с ослабленным андрогенным и усиленным анаболическим эффектами. АС повышают пластические и энергетические процессы в организме человека, при этом усиливаются функция кроветворения, клеточного дыхания и кислородтранспортную функцию крови. АС стимулируют образование и обновление структурных единиц костей, мышц и других тканей человеческого организма. Они повышают аппетит, увеличивают мышечную массу, подавляют образование жировых отложений. В результате повышается выносливость, физическая и интеллектуальная работоспособность. Само название этих средств происходит от термина «анаболизм», которым обозначают процесс образования клеток и тканей тела.

АС, как фармакологические средства, используют в медицине при состояниях истощения, возникших в результате заболеваний крови, тяжелых травм и ожогов, после химиотерапии злокачественных опухолей. Аналоги половых гормонов, имеющие анаболическую активность, используют в лечении различных нарушений половой сферы у мужчин.

Одно из первых упоминаний об использовании АС в спорте появилось в 1954 году, когда на чемпионате мира по тяжелой атлетике в Вене спортсмены из Советского Союза с легкостью победили несколько мировых рекордов и завоевали золотые медали во многих весовых категориях. Это объяснялось введением в программу подготовки советских тяжелоатлетов, помимо прочего, инъекций тестостерона. В результате во многих странах начались изучение подобных препаратов для повышения силы, выносливости, результативности, а с 60-х годов также – активное использование, преимущественно, в силовых дисциплинах (тяжелая атлетика, бодибилдинг, борьба и т.п.).

К настоящему времени применение АС в спорте запрещено в соревновательном и во внесоревновательном периодах. В «черный список» WADA включены:

а) экзогенные АС, включая 19-норандростендион, 1-андростендиол, 1-андростендион, 1-тестостерон, 4-гидрокситестостерон и другие соединения со схожей химической структурой или схожими биологическими эффектами;



б) эндогенные АС: андростендиол, андростендион, дигидротестостерон, тестостерон, а также их метаболиты и изомеры.

Несмотря на запреты и множество статей о вреде применения подобных препаратов, употребление АС широко распространено, и не только среди профессиональных спортсменов, но и людей, занимающихся спортом время от времени. За последние годы более 50% выявленных случаев использования допинга – это употребление АС.

АС вводятся внутримышечно, либо принимаются перорально. При инъекционном введении вещество попадает непосредственно в кровь, быстрее достигает рецепторов в мышцах, оказывает более выраженный эффект. В случае перорального приема – после всасывания в желудочно-кишечном тракте, подвергается частичному разрушению в печени, и затем поступает в кровь, что приводит к менее выраженному эффекту. Коэффициент связывания с белками плазмы крови АС достигает 98%, что обеспечивает относительно продолжительное нахождение их в организме и действие.

АС взаимодействуют со специальными стероидными рецепторами, которые располагаются на наружной мембране клеток. Наибольшее количество таких рецепторов содержится в мышечных клетках.

Сформировавшийся стероидно-рецепторный комплекс направляется к ядру клетки, где присоединяется к определенным сегментам ДНК. При этом включаются механизмы, повышающие синтез белка. В сочетании с интенсивными тренировками это ведет к поперечному увеличению мышечной клетки (мышечной гипертрофии). Усиленный синтез протеинов рассматривается как главное воздействие стероидов на мышечную клетку, в то же время стероиды обладают еще и сильным антикатаболическим действием. Благодаря им снижается процент протеина, разрушающегося в мышечной клетке.

Кроме того, они повышают проницаемость клеточных мембран для аминокислот, микроэлементов и углеводов. Увеличивается скорость синтеза гликогена. В результате применения АС происходит усиление активности пентозофосфатного цикла, в котором происходит синтез частей белковых молекул из углеводов. АС улучшают углеводный обмен, усиливают действие инсулина, снижают уровень глюкозы в крови.

Еще одно преимущество АС заключается в том, что они повышают в мышечной клетке синтез креатинфосфата, который играет решающую роль в восстановлении АТФ и, таким образом, пополняют энергетический потенциал клетки.

Важным свойством АС является их способность потенцировать действие эндогенного соматотропина (гормона роста). У молодых лиц они способствуют усилению роста и увеличению массы тела, однако нужно учесть, что при этом ускоряется созревание скелета и происходит преждевременное закрытие зон роста.

Выявлено свойство АС улучшать липидный обмен. Показано, что их применение способствует снижению уровня холестерина в крови, обратному развитию ате-

росклеротических бляшек сосудов. Неоднозначно влияние АС на печень. Было отмечено усиление синтеза белка в печени в результате применения АС. Однако у 70% больных наблюдаются застойные процессы в печени и желчевыводящих путях, которые носят транзиторный характер и исчезают после отмены препарата.

Анаболический эффект АС в зависимости от липофильности (структуры заместителей в углеводородном скелете) сохраняется от 14 до 90 суток. Для достижения результатов обычно используют не монотерапию, а комбинацию нескольких препаратов совместно со специальным питанием и дозированными мышечными нагрузками.

В чем же вред АС? Наиболее значимое негативное влияние АС оказывают на эндокринную систему. Это выражается в подавлении естественной секреции половых гормонов. Регуляция выработки гормонов осуществляется по принципу «обратной связи». Введение экзогенного тестостерона через подавление деятельности гипоталамуса приводит к снижению выработки и выброса эндогенного тестостерона, что вызывает у мужчин признаки гинекомастии. У женщин идет обратный процесс: происходит оволосение по мужскому типу, изменение голосовых связок – огрубение голоса, нарушается менструальный цикл, вплоть до аменореи.

Длительный прием АС приводит к снижению секреции инсулина, нарушается гликолиз и неогликогенез. Изменяется обмен жиров с избыточным образованием атерогенных жиров и ранним формированием распространенного атеросклероза. В результате страдает сердечно-сосудистая система. Последствиями приема могут быть гипертония, ишемическая болезнь сердца, нарушение мозгового кровообращения [1].

Частыми побочными эффектами АС являются тошнота, рвота, нарушение стула. Страдает детоксикационная функция печени, наблюдается гепатомегалия, фиброз и цирроз печени. Многолетнее употребление АС увеличивает риск образования камней в желчном пузыре и его протоках, а также может приводить к злокачественному опухолевому росту.

Выделительная система страдает преимущественно за счет возникновения мочекаменной болезни. Мужчины, принимающие анаболические стероиды, достоверно чаще страдают заболеваниями предстательной железы – простатитами, аденомой простаты, раком простаты.

По мнению ряда исследователей, прием АС оказывает негативное психологическое воздействие, побуждая спортсмена к усиленным тренировкам, что порой оказывает более сильное воздействие на организм, чем химические препараты. Слишком частые и жесткие тренировки становятся причиной повреждения соединительных тканей. Кроме того, возникают расстройства настроения в виде депрессий различной выраженности. Зачастую человек становится агрессивным, раздражительным, у него нарушается сон [1].

Огромный вред организму наносят и используемые спортсменами приемы сокрытия использования допинговых АС. Для быстрого разрушения транспорт-

ных альбуминов крови и жировых депо, где, благодаря своим свойствам, могут долго задерживаться АС, используется «голодание», в том числе и «сухое голодание». Это оказывает негативное действие на органы выведения (печень, почки) и может привести к неблагоприятным осложнениям.

С 1982 году Международный Олимпийский Комитет сделал обязательным определение повышенного уровня тестостерона у спортсменов. Выявление употребления АС основано на расчете соотношения уровня тестостерона и эпитестостерону. Величина этого соотношения более 4 рассматривается как возможное злоупотребление, требует более пристального мониторинга биосред данного спортсмена, а величина более 6 указывает на введение экзогенного АС.

Некоторые АС (например, нандролон, метандиенон) включены в Список сильнодействующих и ядовитых веществ ст. 234 и других статей УК РФ, утвержденный Постановлением Правительства РФ от 29 декабря 2007 № 964, то есть, их незаконный оборот в целях сбыта подпадает под действие ст. 234 УК (незаконные изготовление, переработка, приобретение, хранение, перевозка или пересылка в целях сбыта, а равно незаконный сбыт сильнодействующих или ядовитых веществ, не являющихся наркотическими средствами или психотропными веществами, либо оборудования для их изготовления или переработки), что влечет за собой юридические последствия [2].

Для допинг-контроля проб на наличие запрещенных АС в настоящее время используют современные высокочувствительные и достоверные аналитические технологии: газовую и высокоэффективную хромато-масс-спектрометрию, радиоиммунный анализ, радиоизотопный анализ и др.

Значительный прогресс в области антидопинговой экспертизы, применение новейшего аналитического оборудования и технологий с повышенными разрешающими возможностями не дают ни одного шанса несанкционированному применению допинга как в учебно-тренировочном процессе, так и в ходе соревнований [3, 4].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Залесский В. Н., Дынник О. Б. Побочные эффекты действия анаболических андрогенных стероидов. Спортивная медицина. № 1. Национальный научный центр «Институт кардиологии им. академика Н. Д. Стражеско». – Киев: АМН. Украины. 2007.
2. Постановление Правительства РФ от 29.12.2007 г. № 964 г. «Об утверждении списков сильнодействующих и ядовитых веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Российской Федерации, а также крупного размера сильнодействующих веществ для целей статьи 234 Уголовного кодекса Российской Федерации». Available at: <https://rg.ru/2008/01/16/veshestva-dok.html>
3. Прасолов И. С., Соболевский Т. Г., Родченков Г. М. Определение синтетических аналогов эндогенных стероидов в моче методом изотопной хромато-масс-спектрометрии. *Масс-спектрометрия*. 2012; 9(2): 83–92.
4. Родионова Г. М., Белова М. В., Раменская Г. В., Петухов А. Е. Скрининговые методы в химико-токсикологическом и судебно-химическом анализе. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2018; 61(3): 31–34.

## REFERENCES

1. Zaleskiy V. N., Dynnik O. B. Side effects of anabolic androgenic steroids. Sports Medicine. № 1. *National Scientific Center «Institute of Cardiology named after academician N. D. Strazhesko»*. – Kiev: AMS. Ukraine. 2007 (In Russ.).
2. Decree of the Government of the Russian Federation of December 29, 2007 № 964 «On approval of lists of potent and toxic substances for the purposes of Article 234 and other articles of the Criminal Code of the Russian Federation, as well as the large size of potent substances for the purposes of Article 234 of the Criminal Code of the Russian Federation». Available at: <https://rg.ru/2008/01/16/veshestva-dok.html> (In Russ.).
3. Prasolov I. S., Sobolevsky T. G., Rodchenkov G. M. Determination of synthetic analogues of endogenous steroids in urine by isotope chromatography mass spectrometry. *Mass Spectrometry*. 2012; 9(2): 83–92 (In Russ.).
4. Rodionova G. M., Belova M. V., Ramenskaya G. V., Petukhov A. E. Screening methods in chemical-toxicological and forensic-chemical analysis. *Forensic medical examination*. 2018. 61(3): 31–34 (In Russ.).

## ПРИМЕНЕНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ В КАЧЕСТВЕ ДОПИНГА

**А. А. Короткова, М. В. Белова,  
Н. В. Горпинченко, Г. М. Родионова**

## USE OF STIMULANTS AS DOPING

**A. A. Korotkov, M. V. Belova,  
N. V. Gorpinchenko, G. M. Rodionova**

Одни из наиболее применяемых в настоящее время допинговых средств являются стимуляторы ЦНС, способствующие интенсивному использованию эндогенных энергетических ресурсов организма, тем самым повышая функциональные возможности организма [1].

Активное использование спортсменами стимулирующих препаратов началось с середины XX века. На зимних Олимпийских играх в 1952 году были отмечены случаи использования фенамина (амфетамина) конькобежцами. В результате приема во время соревнований у спортсменов развилась острая сердечная недостаточность, и они были госпитализированы. На Играх в 1956 году аналогичный случай произошел с велосипедистами. Только после гибели датского спортсмена в результате применения фенамина на Олимпиаде 1960 года, Международный олимпийский комитет начал борьбу с этим допингом [2].

Допинг-эффект стимуляторов заключается в повышении выносливости и работоспособности, общего тонуса организма, снятии усталости, подавлении аппетита. Любая физическая нагрузка сопровождается выделением адреналина в кровь и доставкой его к тканям. Под влиянием стимуляторов происходит увеличение продукции адреналина во время физической нагрузки, что способствует повышению сократительной способности мышечных волокон, увеличению просвета бронхов, и, в связи с этим – увеличению доступа кислорода к легким, возрастанию сердечного выброса и поступления крови к мышцам, а также повышению эффективности использования глюкозы и

свободных жирных кислот крови в качестве источника энергии. Кроме того, стимуляторы повышают возбудимость, внимание, концентрацию, самоуверенность, что необходимо для победы во многих видах спорта. Так, например, с помощью стимуляторов значительно повышается концентрация внимания и скорость ответной реакции при игре в теннис. С другой стороны, чрезмерное возбуждение может вызвать усиление мышечного тремора и неустойчивость положения тела, что, в свою очередь, может привести к снижению спортивного результата в таких видах спорта, как стрельба из лука и огнестрельного оружия [1, 3]

Использование стимуляторов в тренировочном процессе и при подготовке к соревнованиям недопустимо с медицинской точки зрения, так как они имеют ряд серьезных побочных эффектов. Они маскируют развитие утомления, вследствие чего спортсмены способны выполнять физические нагрузки сверх естественного предела. Прием высоких доз может вызывать психические расстройства и галлюцинации, а также тяжелые осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы. Резкое сужение сосудов приводит к повышению артериального давления, центральная стимуляция сердечной мышцы – к тахикардии, возрастает риск развития тромбоэмболии, ишемии, инфаркта миокарда, которые нередко заканчиваются летальным исходом. Сужение кровеносных сосудов и повышение кровяного давления с выраженным потоотделением приводят к срыву механизмов терморегуляции и тепловому удару. Стимуляторы также повышают диурез, что, совместно с обильным потоотделением, способствует обезвоживанию организма [1].

Стимуляторы, такие как: кокаин, амфетамин, метамфетамин, селегилин, сибутрамин, фентермин, катин, катинон и его аналоги (мефедрон, метедрон, альфа-пирролидиновалерофенон), никетамид, мезокарб, стрихнин и многие другие, входят в число субстанций, запрещенных WADA в соревновательный период (класс S6). В 2018 году к списку стимуляторов был добавлен 1,3-диметилбутиламин, который встречается в некоторых пищевых добавках для снижения веса и повышения умственной способности [4]. Некоторые стимулирующие вещества, такие как кофеин, фенилэфрин и никотин, в настоящее время не являются запрещенными субстанциями, но включены WADA в программу мониторинга 2018 года [4].

Некоторые из перечисленных веществ являются лекарственными препаратами. Например, назальный спрей «Ринофлуимуцил» содержит туаминогептан, который включен в Запрещенный список Всемирного антидопингового агентства как стимулятор, применение которого запрещено в соревновательном периоде. В случае, если спортсмену по медицинским показаниям необходимо использовать препарат, содержащий запрещенную субстанцию, ему необходимо заранее обратиться за разрешением на его использование [2, 5].

Среди стимуляторов есть вещества, которые запрещены не только допинг-контролем, но и законом, как наркотические средства. Так, амфетамин, метамфетамин, катин, катинон и его производные входят в Список I Перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в РФ (оборот запрещен). Фентермин и кокаин включены в Список II настоящего Перечня – их оборот ограничен на территории РФ. Мезокарб – психотропное вещество, оборот которого на территории РФ ограничен, но допускается исключение некоторых мер контроля (Список III). В начале использования эти стимуляторы повышают выносливость и работоспособность спортсмена, но при систематическом употреблении формируется привыкание (толерантность) и наркотическая зависимость [2, 4].

Многие стимуляторы используются не только спортсменами в качестве допинга, но и вне спорта – как наркотики. Их употребление вызывает улучшение настроения, эйфорию, повышение мотивации, общительности и двигательной активности, однако, в конечном счете, приводит к физической и психической зависимости. Отмечены случаи тяжелых острых отравлений психостимуляторами. Их прием в сочетании с высокими физическими нагрузками часто приводит к летальному исходу, причинами которого являются перечисленные выше сердечная недостаточность, гипертермия, тромбоэмболия и обезвоживание [2].

Некоторые стимуляторы, благодаря своей способности подавлять аппетит, могут использоваться в качестве средства для похудения. Известны, так называемые, «таблетки для похудения», содержащие вместе с разрешенными растительными компонентами синтетические психостимуляторы. Бесконтрольный прием таких «лекарств» от лишнего веса приводит к формированию наркотической зависимости, а в некоторых случаях – к летальному исходу [2].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Только для медицинских специалистов. Available at: <https://www.rlsnet.ru/> (accessed 12.05.2018).
2. Горчакова Н. А., Гудивок Я. С., Гунина Л. М. и др. Фармакология спорта. Под общ. ред. Олейника С. А., Гуниной Л. М., Сейфуллы Р. Д. – К.: Олимп. литература. 2010.
3. Рефераты: Медицина, здоровье. Available at: <http://www.zodorov.ru/> (accessed 12.05.2018).
4. Консультант плюс. Available at: <http://www.consultant.ru/> (accessed 12.05.2018).
5. Русада. Available at: <http://www.rusada.ru/> (accessed 12.05.2018).

## REFERENCES

1. Only for medical professionals. Available at: <https://www.rlsnet.ru/> (accessed 12.05.2018).
2. Gorchakova N. A., Gudivok Ya. S., Gunin LM, et al. Pharmacology of Sport. Under total ed. Oleynik S. A., Gunina L. M., Seyfulla R. D. – K.: Olympus. literature. 2010 (In Russ.).
3. Abstracts: Medicine, health. Available at: <http://www.zodorov.ru/> (accessed 12.05.2018).
4. Consultant Plus. Available at: <http://www.consultant.ru/> (accessed 12.05.2018).
5. Rusada. Available at: <http://www.rusada.ru/> (accessed 12.05.2018).



## КРОВЯНОЙ ДОПИНГ

**А. И. Муравьева, М. В. Белова, Н. П. Садчикова**

### BLOOD DOPING

**A. I. Muravyova, M. V. Belova, N. P. Sadchikova**

Кровяной допинг представляет собой введение крови или ее продуктов спортсмену. Особое распространение он получил после Олимпийских игр 1968 года, которые проводились в Мехико в условиях высокогорья, где результаты многих спортсменов оказались ниже ожидаемых. Это привело к изучению влияния кислородтранспортной функции крови на спортивную работоспособность и открытию эритрогенного повышающего работоспособность воздействия манипуляций с кровью. Так было установлено, что забор у спортсмена определённых порций крови и их последующее введение через 3–4 недели приводит к увеличению максимального потребления кислорода организмом на 8–10%.

Существует много разновидностей кровяного допинга: переливание как собственной, так и донорской крови, применение препаратов стимулирующих эритропоэз, (ЭПО, препарат CERA, генные препараты ЭПО нового поколения), введение искусственных переносчиков кислорода на основе перфторанов и т.д. Все они представляют собой вызов для антидопинговых организаций.

Поэтому в 1987 г. МОК был введен запрет на применение кровяного допинга:

В соответствии со статьей 4.2.2 Всемирного антидопингового кодекса запрещены следующие манипуляции с кровью и ее компонентами:

1. Первичное или повторное введение любого количества аутологической, аллогенной (гомологичной) или гетерологичной крови или препаратов красных клеток крови любого происхождения в систему кровообращения.
2. Искусственное улучшение процессов потребления, переноса или доставки кислорода, включая, (но, не ограничиваясь):  
Перфтораны; модифицированные препараты гемоглобина, микрокапсулированный гемоглобин, за исключением введения дополнительного кислорода путем ингаляции.
3. Любые формы внутрисосудистых манипуляций с кровью или ее компонентами физическими или химическими методами.

Одновременно крайне остро встает проблема выявления использования кровяного допинга. В настоящее время не разработано надёжного способа его обнаружения, особенно если речь идет о введении собственной крови спортсмена.

Попытки выявить применение кровяного допинга по излишне высокому уровню гемоглобина не приводят к успеху, поскольку высокие значения гемоглобина могут быть обусловлены генетически-

ми особенностями организма спортсмена, методами тренировки, подготовкой в условиях высокогорья. Ситуация обостряется тем, что в спорте получили распространение официально разрешённые в медицине гормональные средства, способствующие повышению гемоглобина и применяемые при анемии. В качестве такого средства особое распространение получил эритропоэтин (ЭПО) – синтетический аналог человеческого естественного гормона, который вырабатывается почками. Активизируя образование красных кровяных телец, ЭПО повышает способность организма доставлять кислород через кровотоки к мышцам, приводит к приросту аэробной мощности без увеличения объёма циркулирующей крови. Применение этого препарата в течение 7 недель способно повысить выносливость на 10%. В то же время, чрезмерные дозы ЭПО могут привести к опасному для здоровья повышению гематокрита и угрозе не только здоровью, но и жизни. У спортсменов, принимающих эритропоэтин, может возникнуть тромбоз сосудов, нарушения деятельности сердца.

Признание эритропоэтина допингом и запрет на его применение в 2000г. проблемы не сняли – появились препараты аналогичного действия, не запрещённые МОК. На смену ЭПО пришел ещё более эффективный препарат – дарбэпоэтин.

Дарбэпоэтин альфа – синтетическое производное человеческого белка эритропоэтина. Он оказывает на организм такое же фармакологическое воздействие, как рекомбинантный человеческий ЭПО, но сохраняет свои уровни в крови примерно в три раза дольше, при гораздо большем и длительном терапевтическом окне.

Для того, чтобы отслеживать биологические показатели спортсмена, WADA был утвержден, так называемый, биологический паспорт спортсмена (БПС).

БПС – это индивидуальный электронный документ, в который заносятся данные конкретного спортсмена. В основу БПС положен принцип мониторинга на долгосрочной основе биологических маркеров, изменение которых происходит в результате применения допинга или патологических изменений в организме. Основная цель такого мониторинга соблюдение принципа честных соревнований и охрана здоровья спортсменов.

Одним из обязательных составляющих БПС является гематологический паспорт спортсмена (ГПС). В нем собрана вся информация о маркерах эритропоэза, измеренных в пробах крови спортсмена. ГПС позволяет обнаружить любую форму рекомбинантного ЭПО, а также любую форму переливания крови или манипуляций с составом крови. WADA зарегистрировало следующие параметры, которые обязательно регистрируются в ГПС:

HCT: hematocrit (гематокрит).

HGB: hemoglobin (гемоглобин).

RBC: red blood cells count (количество эритроцитов).

RET%: the percentage of reticulocyte (процентное содержание ретикулоцитов).

RET#: reticulocytes count (количество ретикулоцитов).

MCV: mean corpuscular volume (средний объем эритроцита).

MCH: mean corpuscular hemoglobin (средний эритроцитный гемоглобин).

MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration (средняя концентрация корпускулярного гемоглобина).

В норме количество ретикулоцитов, молодой формы эритроцитов, находится в диапазоне 0,5–1,5% от общего количества красных кровяных телец, однако может и выходить за рамки без исключительных на то причин. При введении крови извне организм ощущает «избыток» эритроцитов и количество натуральных ретикулоцитов спортсмена падает. Однако введенная извне кровь также несет свои ретикулоциты, что в результате может вообще не повлиять на кровяные параметры паспорта. При заборе крови спортсмена с целью последующего переливания в качестве допингового средства организм ощущает временно недостаток крови, что стимулирует гемопоэз (новообразование клеток крови), в результате чего растет концентрация ретикулоцитов. Аналогичные изменения происходят с гемоглобином: при заборе крови гемоглобин падает, а при переливании резко возрастает.

Таким образом, мониторинг двух параметров (ретикулоцитов и гемоглобина) используют для выявления возможных манипуляций с кровью. Соотношение гемоглобина к ретикулоцитам – расчетный показатель *OFF-score* или индекс стимуляции – позволяет с большей надежностью выявить как забор крови (падение гемоглобина и рост ретикулоцитов), так и обратное переливание крови (падение ретикулоцитов и рост гемоглобина).

Применение кровяного допинга также можно выявить при исследовании мочи, используя косвенные показатели. Для хранения крови и при ее переливаниях используется ряд вспомогательных веществ: противосвертывающие агенты, консерванты, иммуносупрессоры и др., из оборудования в кровь мигрируют пластификаторы. Указанные вещества обнаруживаются в моче и являются косвенными маркерами «кровяного» допинга.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Всемирный антидопинговый кодекс Международный стандарт. Запрещенный список 2018 года.
2. Reichel C., Thevis M. Detection of EPO-Fc fusion protein in human blood: screening and confirmation protocols for sports drug testing. *Drug. Test. Anal.* 2012; 4(11): 818–829.

## REFERENCES

1. World Anti-Doping Code International Standard. Forbidden List 2018.
2. Reichel C., Thevis M. Detection of EPO-Fc fusion protein in human blood: screening and confirmation protocols for sports drug testing. *Drug. Test. Anal.* 2012; 4(11): 818–829.

## СОВРЕМЕННЫЕ ВИДЫ ДОПИНГА: ГЕННЫЙ ДОПИНГ

И. С. Митякина, М. В. Белова, В. И. Гегечкори

## MODERN TYPES OF DOPING: GENE DOPE

I. S. Mityakina, M. V. Belova, V. I. Gegchkori

Достижения в области генной инженерии привели к разработке и расширению возможностей генной терапии. Она направлена на компенсацию дефектных, мутированных генов или усиление экспрессии гена и, таким образом, на лечение наследственных патологий (кистозный фиброз, гемофилия, тяжёлый комбинированный иммунодефицит (SCID), анемии, а также онкологических, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболеваний.

Некоторые новые вещества (например, антитела против миостатина или блокаторов миостатина) могут быть использованы спортсменами в качестве допинга, потому что их введение приводит к значительному увеличению мышечной массы и мышечной силы. Хотя доказано, что неконтролируемая манипуляция генетическим материалом и/или введение рекомбинантных белков могут быть связаны с рисками для здоровья, спортсмены все чаще обращаются к этим запрещенным методам.

Запрещенный список WADA определяет генный допинг (ГД) как «перенос полимеров нуклеиновых кислот или аналогов нуклеиновых кислот» и/или «использование нормальных или генетически модифицированных клеток». ГД относится к группе методов, запрещенных как в соревновательный, так и во внесоревновательный период.

В качестве ГД, в первую очередь, рассматриваются гены, контролирующие продукцию белков, действие которых связаны с увеличением выносливости, физической силы, перераспределением жира или увеличением мышечной массы. Некоторые из них контролируют распределение кислорода в тканях, регулируют рост и/или регенерацию мышечной ткани. Кроме того, внимание привлекают гены, кодирующие пептиды, которые повышают болевой порог (например, эндорфины и энкефалины). Их можно использовать вместо запрещенных анальгетиков, при этом выявить их крайне сложно.

В качестве мишеней генного допинга рассматриваются эритропоэтин (EPO), гормон роста (GH), инсулиноподобный фактор-1 (IGF-1), миостатин (MSTN) или сосудистые эндотелиальные факторы роста (VEGF), факторы индуцируемые гипоксией (HIF), PPAR $\alpha$ , PCK1,

Исследования по ГД, которые проводились, в основном, на экспериментальных животных, были крайне успешны. Так, инъекция гена-рецептора-дельта/бета-, активированного пероксисомным пролифератором, в мышечные зиготы улучшала выносливость мышей на беговой дорожке, делала их резистентными к ожирению даже при отсутствии физических упражнений и при высоком содержании жиров в рационе. У

крыс введение инсулиноподобного гена фактора роста-1 (Igf1) приводило к увеличению мышечной массы, силы и выносливости. Передача гена фосфоенолпируваткарбоксикиназы 1 (Pck1) способствовала увеличению активности трансгенных мышей, повышенной скорости во время гонки, и, кроме того, мыши характеризовались более низкой массой и содержанием жира по сравнению с контрольными животными.

При внутримышечной инъекции плазмиды, содержащей ген соматолиберина (Ghrh), под контролем промотора гена, специфичного для мышц, были достигнуты повышенные концентрации гормона роста GH и IGF-1, улучшение анаболических и гематологических параметров, которые сохранялись более года.

Несмотря на отсутствие доказательств того, что ГД когда-либо использовался в спорте, непрерывное совершенствование методов генной терапии увеличивает вероятность злоупотребления им. Поэтому с 2004 года усилия антидопингового сообщества и WADA были направлены на разработку методов его обнаружения.

Основная проблема, которая является приоритетом для спортивных организаций, это трудность в обнаружении ГД.

До сих пор попытки создать и стандартизировать тест для его обнаружения терпели неудачу. Причина в том, что введенный ген и соответствующий ему белок почти идентичны эндогенному аналогу. В настоящее время проводятся несколько интенсивных исследований по ряду перспективных стратегий (например, обнаружение трансгенного белка или носителя генетического материала в месте внутримышечной или тканевой инъекции, мониторинг иммунного ответа после использования вирусного носителя гена или профилирования экспрессии генов).

Были предложены некоторые косвенные методы, направленные на выявление реакций организма (метаболические, транскриптомные, протеомные изменения) в результате доставки и экспрессии трансгена. Однако эта стратегия не учитывает такие факторы, как возраст, пол, которые могут усложнить интерпретацию результатов. Иммунная реакция, возникающая в результате доставки вирусов и плазмид, также была предложена как косвенный метод обнаружения. Однако этому подходу препятствует риск естественной вирусной инфекции, повышающий вероятность ложноположительного результата. Более того, с юридической точки зрения прямые методы всегда предпочтительнее косвенных.

В нескольких исследованиях изучалась возможность обнаружения следовых количеств трансгенной ДНК в образцах крови после внутримышечного переноса гена. Был описан подход к детектированию гена ЭПО в крови, так как белки ЭПО, полученные из трансгенной ДНК в мышечных клетках и белках, кодируемых геномной ДНК, различаются по структуре из-за различных посттрансляционных модификаций в тканях. Таким образом, эти различия могут быть легко

использованы в сочетании с обычным тестом ЭПО. Однако этот метод специфичен для гена ЭПО и не может быть экстраполирован на другие потенциально-используемые гены.

Для долгосрочного обнаружения трансгена в крови были предложены несколько стратегий ПЦР. Несмотря на высокую чувствительность, они являются дорогостоящими и сложными в исполнении. Ни один из этих методов не был реализован в аккредитованных антидопинговых лабораториях. Большинство протоколов включает в себя несколько этапов, увеличивающих риск перекрестного заражения и требующих значительных навыков, времени и дорогостоящего оборудования.

Новый подход к обнаружению ГД – Петлевая изотермическая амплификация (Loop mediated isothermal amplification, LAMP) – техника амплификации ДНК в одной пробирке. Метод LAMP позволяет проводить молекулярную диагностику существенно дешевле и быстрее, по сравнению с ПЦР. Обладая высокой чувствительностью и специфичностью, он проще в исполнении.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Всемирный антидопинговый кодекс Международный стандарт. Запрещенный список 2018 года.
2. Rogol A. D., Pieper L. P. Genes, Gender, Hormones, and Doping in Sport: A Convolved Tale. *Front. Endocrinol.* 2017; 8: 251. DOI: 10.3389/fendo.2017.00251.
3. Salamin O., Kuuranne T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as an alternative to PCR: A rapid on-site detection of gene doping. *Drug Test Anal.* 2017; 9(11-12): 1731–1737. DOI: 10.1002/dta.232.
4. Brzeziańska E., Domańska D., Jegier A. Gene doping in sport – perspectives and risks. *Biol Sport.* 2014; 31(4): 251–259.

## REFERENCES

1. World Anti-Doping Code International Standard. Forbidden List 2018.
2. Rogol A. D., Pieper L. P. Genes, Gender, Hormones, and Doping in Sport: A Convolved Tale. *Front. Endocrinol.* 2017; 8: 251. DOI: 10.3389/fendo.2017.00251.
3. Salamin O., Kuuranne T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as an alternative to PCR: A rapid on-site detection of gene doping. *Drug Test Anal.* 2017; 9(11-12): 1731–1737. DOI: 10.1002/dta.232.
4. Brzeziańska E., Domańska D., Jegier A. Gene doping in sport – perspectives and risks. *Biol Sport.* 2014; 31(4): 251–259.

## ФАЛЬСИФИКАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДОПИНГОВОГО КОНТРОЛЯ

**А. С. Соловьева, Т. И. Субботина,  
В. И. Прокофьева, М. В. Белова**

## FALSIFICATION OF DOPING CONTROL RESULTS

**A. S. Solovyova, T. I. Subbotina,  
V. I. Prokofiev, M. V. Belova**

Фальсификация результатов допингового контроля заключается в различных манипуляциях, направленных на их искажение.



Нарушение антидопингового законодательства, выявленное в процессе тестирования, автоматически влечет за собой аннулирование результатов спортсмена, допустившего нарушение в данных спортивных соревнованиях, включая изъятие всех медалей и призов, полученных на этом спортивном соревновании, а также пожизненную дисквалификацию за использование запрещенных субстанций и запрещенных методов. В связи с этим, спортсмены пытаются прибегать к фальсификации проб, когда они заведомо уверены в положительном результате анализа на допинг [1].

Согласно документам WADA запрещены следующие методы:

1. Фальсификация, а также попытки фальсификации отобранных в рамках процедуры допинг-контроля проб с целью нарушения их целостности и подлинности, а именно: а) попытки подмены мочи; б) умышленное загрязнение мочи соединениями, затрудняющими идентификацию допингов.
2. Запрещенные манипуляции и специальные хирургические операции.
3. Применение диуретиков и маскирующих агентов.

Подмена проб во время допинг-контроля является самым «древним» методом. Хотя за процедурой сдачи анализов на допинг установлен жесткий контроль, некоторым атлетам удается подменить пробы при отборе. Кроме того, возможна подмена проб уже в лаборатории, при этом могут использоваться все возможные способы, начиная от подкупа и заканчивая шантажом.

Введение посторонних веществ в пробу – еще один давний способ искажения результата допинг-теста. Среди приемов введение машинного масла, аскорбиновой кислоты, ароматических соединений, стимуляция бактериального роста при несоблюдении гигиенических правил и некоторые другие.

Многие допинговые вещества депонируются в богатых липидами тканях организма, поэтому эти вещества и их метаболиты могут обнаруживаться в моче достаточно долго после приема. Чтобы ускорить их выведение из организма, проводят так называемую «сушку» тела, направленную на удаление избытка жидкости и сжигание жировой ткани. Для этого используют периодическое посещение бани (сауны), разгрузочные дни и голодание.

Многие тренеры и специалисты уверены, что применением диуретиков (однократно или курсом) можно скрыть прием запрещенных веществ. Допинг-эффект при применении диуретиков заключается в быстрой потере веса, маскировке применения других запрещенных препаратов. Строго говоря, диуретики допингом не являются. Но из-за ярко выраженных мочегонных свойств они помогают быстрее выводить следы запрещенных веществ. Для подобных препаратов в черном списке WADA есть отдельный класс – маскирующие агенты. Их наличие косвенно указывает на прием допинга [2].

Прием диуретиков может приводить к серьезным негативным эффектам: обезвоживанию, выведе-

нию жизненно важных элементов, нарушению обмена веществ, снижению давления, повреждению почек. Возникающий дисбаланс электролитов, эссенциальных микроэлементов влияет на работу мозга, мышц и сердца. При этом возникают аритмии, вплоть до остановки сердца, головокружение, судороги. Диуретики снижают физическую работоспособность и переносимость нагрузок, нарушают терморегуляцию, приводят к обезвоживанию. Следствием этого может быть повышение вязкости крови, увеличивается риск тромбообразования.

Протеазные ферменты (ПФ) – еще одна группа средств для фальсификации результатов допинг-контроля. ПФ являются естественными пищеварительными ферментами, осуществляющими переваривание протеинов и пептидов в желудочно-кишечном тракте. Исследования последних лет показали их способность при однократном и курсовом назначении уменьшать микроповреждения скелетной мускулатуры и снижать болезненные ощущения в мышцах после физических нагрузок. ПФ также применяют для фальсификации анализа на эритропоэтин.

Синтетические гормоны щитовидной железы (Т3 и Т4) способствуют распаду белков, в том числе и транспортных. Они способствуют переведению связанных с белком анаболических стероидов и др. запрещенных субстанций в свободную форму и быстрейшему их выведению из организма.

Для ускорения метаболизма и выведения допинговых средств применяют фенобарбитал, который является активатором цитохромов Р450 – ферментов монооксигеназной системы печени. Его применяют как отдельный препарат, так и в составе комплексных лекарственных средств (корвалола, валокордина, пенталгина и др.). Фенобарбитал входит в список запрещенных препаратов [2].

Наиболее популярным маскирующим агентом являлся Пробенецид – препарат, который обычно прописывают больным, страдающим подагрой. Он усиливает выведение мочевой кислоты, облегчает выделение анаболических стероидов с мочой.

Примером сокрытия применения допинга может служить ситуация, связанная с российскими спортсменами. В ходе олимпийского допингового скандала 2016 года, WADA опубликовала отчет, в котором описала так называемый допинговый коктейль «Дюшес», который якобы применяли российские атлеты. Для приготовления анаболические стероиды: Орал-туринабол, Оксандролон, Метилдростенолон растворялись в алкогольных напитках (шотландский виски Чивас для мужчин и Вермут для женщин). Полученной смесью было необходимо полоскать рот, не проглатывая. Анаболические стероиды хорошо растворимы в спирте и в процессе полоскания проникают через слюсуды полости рта в кровоток, минуя печень. При этом физико-химические методы анализа, доступные на тот момент, улавливали перечисленные запрещенные субстанции лишь в течение 3–5 дней, что существенно

меньше по сравнению с оральным или инъекционным введением [3].

В документах WADA существует статья «Фальсификация или попытка фальсификации на любом этапе допинг контроля». Под эту статью попадает любое поведение, которое препятствует выполнению процедур допинг-контроля намеренное создание препятствий сотруднику допинг-контроля, предоставление ложной информации антидопинговой организации или запугивание потенциальных свидетелей. Данная статья запрещает изменение персональных номеров в протоколе допинг контроля во время тестирования, разбивание флакона с пробой или добавление в пробы посторонних веществ.

Организован специальный отдел расследования нарушений во время проведения допинг-контроля. Согласно уставу Ассоциации Российского антидопингового агентства «РУСАДА» к одному из основных видов деятельности агентства относится расследование случаев возможного нарушения антидопинговых правил. Деятельность Отдела регламентируется законодательством РФ, Общероссийскими антидопинговыми правилами, Международным Стандартом по тестированию и расследованиям. Отдел занимается сбором и анализом информации, её проверкой. Также в функции Отдела входит работа с информаторами

и осведомителями, сохраняя их конфиденциальность и поощряя стремление оказать содействие в борьбе с допингом в спорте.

Судя по публикациям, заключениям МК МОК, допинги применялись и применяются во всех странах. Однако, на сегодняшний день благодаря четкой процедуре антидопингового контроля, совершенствованию методов анализа, информационно-аналитической работе, в большинстве случаев удается обнаружить применение допинга.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Процедурные правила допинг-контроля. – М.: *Терра-Спорт, Олимпия Пресс*. 2002; 80 с.
2. Семенов В. А. Лекарственные средства в спорте. – М. 1994; 67–69 с.
3. РБК. Спортсмены рассказали об употреблении допингового «коктейля Родченкова». Available at: <https://www.rbc.ru/society/08/11/2017/5a0339f79a7947299b501aac> (accessed 14.05.2018).
4. Русада. Available at: <http://www.rusada.ru/> (accessed 14.05.2018).

## REFERENCES

1. Doping Control Procedure Rules. – M.: *Terra-Sport Olympia Press*. 2002; 80 p.
2. Semenov V. A. Medicines in sport. – M. 1994; 67–69 p.
3. RBC. Athletes told about the use of doping «Rodchenkov cocktail». Available at: <https://www.rbc.ru/society/08/11/2017/5a0339f79a7947299b501aac> (accessed 14.05.2018).
4. Rusada. Available at: <http://www.rusada.ru/> (accessed 14.05.2018).



СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ



# СЕЧЕНОВСКИЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ БИОМЕДИЦИНСКИЙ САММИТ 2019



20–21 мая 2019 года,  
Москва



**SIBS 2019**

[www.sechenov-sibs.confreg.org](http://www.sechenov-sibs.confreg.org)



## ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этического поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля «Разработка и регистрация лекарственных средств» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», должно соответствовать науке:

- 02.00.00 – химические науки;
- 03.02.00 – общая биология;
- 03.03.00 – физиология;
- 14.04.00 – фармацевтические науки.

Публикуемые материалы должны соответствовать следующим критериям:

- Научная актуальность и значимость проблемы, которой посвящена статья (тематика статьи должна представлять интерес для широкого круга исследователей, занимающихся разработкой и регистрацией лекарственных средств).
- Высокая степень доказательности (современная исследовательская база, наличие сертификатов на оборудование, достаточный объем выборки и подходы к математической обработке результатов исследования).
- Концептуальный характер исследования (авторы не должны ограничиваться констатацией фактов, необходим анализ полученного материала с учетом данных литературы, должны быть высказаны новые идеи и гипотезы).

### УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

1. К рассмотрению принимаются материалы только в электронном виде, направленные в редакцию через систему на сайте в формате .doc или .docx (незащищенный формат файлов).
2. Рассматриваются только оригинальные материалы, ранее не публиковавшиеся и не нарушающие авторские права других лиц. Все статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат»; уникальность текста статьи должна составлять не менее 75%. При выявлении подобных текстов одного и того же автора в других печатных и электронных изданиях, статья снимается с публикации.
3. Согласно требованиям Высшей аттестационной комиссии, журнал предоставляет приоритет для аспирантских и докторских работ, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате \*.pdf или \*.jpg).

### ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». В случае не-

соответствия правилам оформления Редакция вправе отказать в публикации или прислать свои замечания к статье, которые должны быть исправлены Автором перед рецензированием.

2. Все рукописи, прошедшие первичный отбор, направляются по профилю научного исследования на экспертизу и проходят обязательное конфиденциальное рецензирование. Все рецензенты являются признанными специалистами, имеющими публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних 3 лет или в области обработки данных. Рецензирование проводится конфиденциально как для Автора, так и для самих рецензентов. При получении положительных рецензий работа считается принятой к рассмотрению редакционной коллегией, которая выносит решение, в каком номере журнала будет опубликована статья.
3. Все утвержденные статьи поступают в работу к редактору и корректору.

Окончательный макет статьи согласовывается с автором.

### ЕДИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов.

Оригинальную версию «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов, можно посмотреть на сайте [www.ICMJE.org](http://www.ICMJE.org)

Проведение и описание всех клинических исследований должно быть в полном соответствии со стандартами CONSORT – <http://www.consort-statement.org>

### ОБЩИЕ ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

Электронный вариант статьи прилагается в формате A4 Microsoft Word (\*.doc), Поля 2 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пунктов через 1,5 интервала.

Объем рукописи: обзор – 15–20 страниц; оригинальные статьи – 10–12 страниц, включая литературу, таблицы и подписи к рисункам. Страницы рукописи следует нумеровать.

**Перечень документов**, подаваемый на рассмотрение в редакцию журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», должен включать в себя:

1. Сопроводительное письмо.
2. Текст статьи.

#### 1. СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ПИСЬМО

Авторы должны предоставить заполненное и подписанное сопроводительное письмо, приложив к нему указанные в тексте письма документы.

#### 2. РУКОПИСЬ

##### РУССКОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

##### Титульный лист:

1. УДК;
2. название статьи;
3. фамилии и инициалы авторов;
4. полные названия учреждений (надстрочными арабскими цифрами отмечают соответствие учреждений, в которых работают авторы), полный почтовый адрес учреждений;
5. e-mail и телефон автора, ответственного за контакты с редакцией

##### Резюме и ключевые слова

Объем резюме должен составлять 250–300 слов.

Резюме оригинальной статьи должно быть структурированным:

**Введение** (введение работы в сжатой форме).

**Цель** (цель работы в сжатой форме).

**Материалы и методы** (методы исследования, если необходимо, то указать их преимущества по сравнению с ранее применявшимися методическими приемами; характеристика материала).

**Результаты** (основные результаты исследования).

**Заключение** (основные выводы).

Резюме обзорной статьи также должно быть структурированным:

**Введение** (введение работы в сжатой форме).

**Текст** (описание содержания текста статьи в сжатой форме)

**Заключение** (основные выводы).

Все аббревиатуры в резюме необходимо раскрывать (несмотря на то, что они будут раскрыты в основном тексте статьи). Текст резюме должен быть связанным, с использованием слов «следовательно», «например», «в результате».

На сайте британского издательства Emerald приведены примеры качественных рефератов для различных типов статей (обзоры, научные статьи, концептуальные статьи, практические статьи – <http://www.emeraldinsight.com/authors/guides/write/abstracts.htm?part=2&PHPSESSID=hdac5trtkb73ae013ofk4g8nrv1>)

**Ключевые слова:** (5–8) помещают под резюме после обозначения «Ключевые слова». Ключевые слова должны использовать термины из текста статьи, определяющие предметную область и способствующие индексированию статьи в поисковых системах и не повторять название статьи.

#### АНГЛОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

##### Article title

Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

##### Affiliation

Необходимо указывать официальное англоязычное название учреждения и почтовый адрес. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ: <http://elibrary.ru>

##### Образец оформления

Mental Health Research Institute

4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

##### Abstract

Резюме статьи на английском языке должно по смыслу и структуре (для оригинальной статьи: Introduction, Aim, Materials and methods, Results and discussion, Conclusion; для обзорной статьи: Introduction, Text, Conclusion) соответствовать русскоязычному, по содержанию может быть более полным. Необходимо использовать активный, а не пассивный залог. Во избежание искажения основных понятий желательно иметь соответствующие английские термины. Это особенно важно, когда приводятся названия особых заболеваний, синдромов, упоминаются авторы или конкретные методы.

##### Keywords

Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

#### ОСНОВНОЙ ТЕКСТ

Оригинальные статьи должны иметь следующую структуру: а) введение; б) материалы и методы; в) результаты; г) обсуждение; д) заключение.

Обзорные статьи должны иметь следующую структуру а) введение; б) текст; д) заключение.

Текст обзорной статьи следует разделять на соответствующие содержанию статьи подразделы.

##### Введение

В разделе дается обоснование актуальности исследования и четко формулируется цель исследования.

##### Материалы и методы

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 ([grls.rosminzdrav.ru](http://grls.rosminzdrav.ru)). При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру вы-

данных 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: Синдрон-нол 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 Кан-го Фармацевтикал 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.

Рукописи статей, в которых при достаточном объеме экспериментальных данных отсутствует статистический анализ, а также некорректно использованы или описаны применяемые статистические методы, могут быть отклонены редакцией журнала.

Необходимо давать определение всем используемым статистическим терминам, сокращениям и символическим обозначениям. Например,  $\bar{M}$  – выборочное среднее;  $m$  – ошибка среднего;  $\sigma$  – стандартное квадратичное отклонение;  $p$  – достигнутый уровень значимости и т.д. Если используется выражение типа  $M \pm m$ , указать объем выборки  $n$ . Если используемые статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариативности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости  $p$  для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами, и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т.п.).

#### Результаты и обсуждение

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подробные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

#### Заключение

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

##### Конфликт интересов

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, написании рукописи и т.д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

##### Источник финансирования

Необходимо указывать источник финансирования, как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

##### Соответствие принципам этики

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

##### Благодарности

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

#### ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по алфавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

**Не следует ссылаться:** на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

**Следует избегать** ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных, должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

**Недопустимо самоцитирование**, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (in Russ.). Приводится английское название журнала (название сверяется с официальным сайтом издания) через тире после транслитерации названия и оформляется курсивом.



Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте <http://www.translit.ru>

1. Войти на сайт translit.ru. В окошке «варианты» выбрать систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставить в специальное поле ФИО авторов, название издания на русском языке и нажать кнопку «в транслит».
2. Копировать транслитерированный текст в готовящийся список.
3. Перевести с помощью переводчика Google название книги, статьи на английский язык, перенести его в готовящийся список. Перевод, безусловно, требует редактирования, поэтому данную часть необходимо готовить человеку, понимающему английский язык.
4. Объединить транслитерируемое и переводное описания, оформляя в соответствии с принятыми правилами.
5. В конце описания в круглых скобках указывается (in Russ.).

Образец оформления списка литературы

#### Литература/References

1. Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева, 2015:272 [Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznanov N. G. Introduction to psychopharmacogenetics. St.-Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva, 2015:272 (in Russ.)].
2. Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013; 15 (1):20–23 [Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer] *Onkologiya – Oncology*. 2013; 15(1): 20–23 (in Russ.)].
3. Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008; 7 (1): 58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.
4. Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008; 29 (7): 777–822. DOI: 10.1210/er.2008–0024.

**В библиографическом описании** каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства, либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Не допустимо сокращать название статьи.

**Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций**

#### Монографии

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

#### Образец оформления

Для русскоязычных источников

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009:328 [Sokolova G. N., Potapova V. B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009:328 (in Russ.)].

Для англоязычных источников

Jenkins P. F. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press, 2005: 194.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название ста-

тьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

#### Образец оформления

Для русскоязычных источников

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014; 13 (3): 53–57 [Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika – Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014; 13 (3): 53–57 (in Russ.)].

Для англоязычных источников

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L. B. Obesity among individuals with serious mental illness. *Acta Psychiatr Scand*. 2006; 113 (4): 306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

**Варианты библиографического описания материалов конференций:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/>

**Варианты библиографического описания патентов:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/>

**Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/>  
**DOI**

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте <http://search.crossref.org/> или <https://www.citethisforme.citethisforme.com>.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

#### ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

#### Таблицы

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ \*. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

#### Рисунки

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подрисуночной подписью на русском и английском языках. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутрисуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подрисуночных подписей на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате \*tif, \*jpg, \*cdr, \*ai. с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номеру рисунка.





## Обучающий курс для предприятий «Тест «Растворение» и СТПР в разработке и регистрации лекарственных средств» лекарственных средств»

*«В подавляющем большинстве случаев причиной неудач в исследовании  
биоэквивалентности дженерика является неэквивалентность кинетики  
растворения препаратов»*

GLP/ISO-9001-сертифицированная лаборатория «Центр Фармацевтической Аналитики» и научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» приглашает на обучающий курс для предприятий «Тест «Растворение» и СТПР в разработке и регистрации лекарственных средств».

Курс предназначен для сотрудников отделов разработки, контроля качества, обеспечения качества, регистрации лекарственных средств.

Слушатели предварительно могут прислать список интересующих их вопросов по теме семинара, которые обязательно будут рассмотрены. Обучение построено по принципу **адаптивного семинара**, поэтому длительность каждой из лекций, уровень сложности (базовый или продвинутый) и тематические акценты определяется исходя из потребностей аудитории. Курс также подразумевает решение ситуационных задач и практических занятий. По окончании семинара проводится тестирование слушателей и выдача сертификатов участника.



Курс читает генеральный директор ООО «ЦФА» доктор фармацевтических наук **Шохин Игорь Евгеньевич**.

Главный редактор научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств».

Ведущий переводчик и научный редактор русского издания Европейско Фармакопеи.

Председатель оргкомитета цикла конференций «Исследования кинетики растворения, фармакокинетики и биоэквивалентности».

Автор монографии «Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств».

Стоимость мероприятия **9 900 руб.** с человека (для групп численностью 10 человек и более. Для групп менее 10 человек стоимость обучения составляет 99 000 руб./группа)\*.

Обучение может проводиться как на базе ООО «ЦФА» (г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3) ближайшая дата обучения – **14-15 марта 2019 г.**, так и на базе Вашего предприятия в удобное для Вас время.

\*Стоимость проезда, проживания и командировочные расходы при проведении выездного семинара за пределами Москвы оплачивается отдельно.

**Курс проводится при технической поддержке**

**ERWEKA**

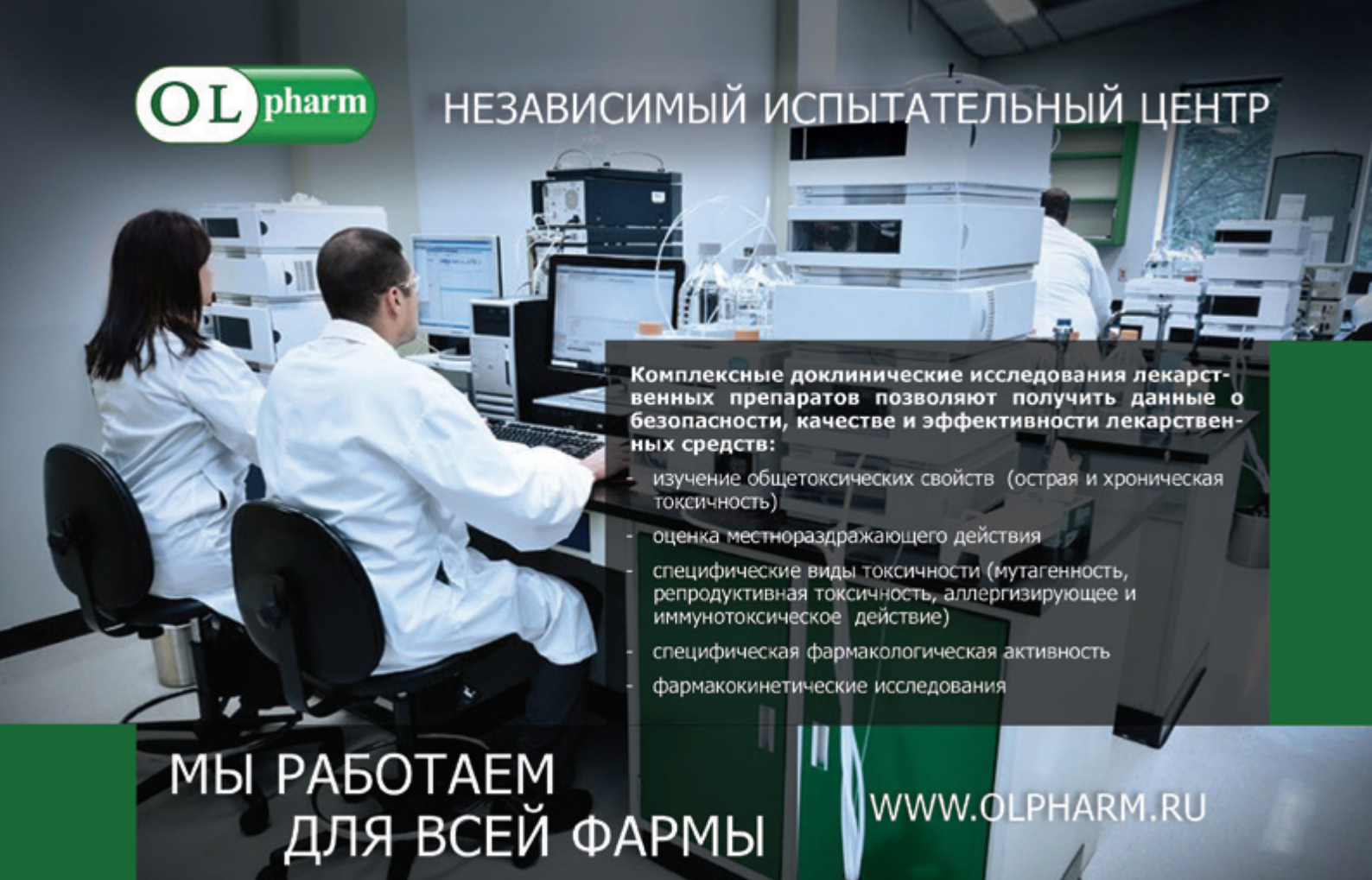


ООО «ЦФА»

Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Тел: +7 (499) 281-81-11 info@cpha.ru www.cpha.ru





**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 (мутagenность, репродуктивная токсичность, алергизирующее и иммунотоксическое действие)
- специфическая фармакологическая активность
- фармакокинетические исследования

## МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВСЕЙ ФАРМЫ

[WWW.OLPHARM.RU](http://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](mailto:info@labware.ru)  
[www.labware.ru](http://www.labware.ru) [www.labware.com](http://www.labware.com)