

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВISSN 2305-2066 (Print)
ISSN 2658-5049 (Online)

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ



+7(499) 682 65 55
promo@chimmed.ru
www.chimmed.ru



Waters SYNAPT HDMS

Масс-спектрометр высокого разрешения **Waters SYNAPT HDMS** – мощный исследовательский инструмент в области протеомики и биофармацевтики.
 Эффективная идентификация и характеристика биологических молекул.



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 СТРК (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 19.1198.026 от 18 июля 2019 г. Сертификат действителен до 3 августа 2022 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 СТРК (сравнительного теста кинетики растворения), определение противоязвенных антител к биологическим лекарственным препаратам.

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

**РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**



При поддержке
ФБУ «ГИЛС и НП»



РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2020. Том 9, № 2

RAZRABOTKA I REGISTRACIÂ LEKARSTVENNYH SREDSTV

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2020. Volume 9, No. 2

Цели и задачи журнала

Научно-производственный рецензируемый журнал «**Разработка и регистрация лекарственных средств**» – актуальное бесплатное ежеквартальное прикладное издание и информационный портал для специалистов, задействованных в сфере обращения лекарственных средств. Журнал предназначен для фармацевтических предприятий-производителей и их сотрудников из отделов разработки, контроля качества, регистрации, производства и развития; сотрудников лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений. Основная цель журнала – обобщение научных и практических достижений в сфере разработки и регистрации лекарственных средств, повышение научной и практической квалификации специалистов сферы обращения лекарственных средств. Основные **пять тематических разделов** журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» включают цикл развития лекарственного средства от его создания до получения регистрационного одобрения. **Первый** раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств, **второй** – фармацевтической технологии и рассматривает научные и практические направления от разработки и производства исходных фармацевтических ингредиентов, технологий и оборудования – до создания стандартных и терапевтически эффективных лекарственных препаратов. **Третий** раздел описывает аналитические методики контроля качества; **четвертый** раздел посвящен подходам к оценке эффективности и безопасности лекарственных средств, проведению доклинических и клинических исследований; в **пятом** разделе рассматриваются вопросы валидации методики, подготовки регистрационного досье, жизненный цикл лекарственного препарата в GxP окружении. Журнал принимает к рассмотрению обзорные и экспериментальные статьи по данной тематике. К публикации в журнале приглашаются как отечественные, так и зарубежные исследователи в области разработки и регистрации лекарственных средств.

Редакционная коллегия

Главный редактор

Шохин И. Е., д.фарм.н., генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», Москва, Россия

Редакционная коллегия

Аммур Ю. И., к.биол.н., зав. лабораторией экспериментальной иммунологии ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Белоусов М. В., профессор, д.фарм.н., заведующий кафедрой фармации ФПК и ППС ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

Боян Салия, Assist. Professor, PhD, University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Белград, Сербия

Василенко И. А., проф., д.х.н., профессор Института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ РУДН, Москва, Россия

Ваизова О. Е., доцент, д.м.н., профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

Вартаньянц И. А., проф., к.ф.-м.н., профессор Deutsches Elektronen-Synchrotron, Гамбург, Германия

Гузев К. С., д.ф.н., уполномоченное лицо АО Фармацевтическое научно-производственное предприятие «Ретиноиды», Москва, Россия

Гусаров Д. А., к.х.н., руководитель группы экспериментального биотехнологического производства Научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Демина Н. Б., проф., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

Емшанова С. В., д.фарм.н., начальник отдела научных разработок ЦКП (НОЦ) ФГАОУ РУДН, Москва, Россия

Каленикова Е. И., проф., д.фарм.н., зав. кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Комаров Т. Н., к.фарм.н., заведующий лабораторией биоаналитических исследований № 2, ООО «ЦФА», Москва, Россия

Кулинич Ю. И., к.фарм.н., эксперт 1 категории ФГБУ НЦ ЭСМП Минздрава России, Москва, Россия

Макеев О. Г., проф., д.м.н., зав. кафедрой биологии и медицинской генетики УГМУ, Екатеринбург, Россия

Малашенко Е. А., к.фарм.н., ст. преп. кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Медведев Ю. В., к.фарм.н., доц. кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Мельников Е. С., к.фарм.н., старший научный сотрудник ЦКФ ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России, Москва, Россия

Мирошниченко И. И., д.м.н., заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ Научный центр психического здоровья (НЦПЗ), Москва, Россия

Мустафин Р. И., к.фарм.н., директор Института фармации ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Минздрава России, Казань, Республика Татарстан

Оборотова Н. А., проф., д.фарм.м., НИМЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия

Попов В. В., проф., д.м.н., зав. лабораторией профессиональной клинической фармакодинамики НУЗ «Научный клинический центр ОАО «РЖД», Москва, Россия

Focus and Scope of the journal

Research and production peer-reviewed journal «**Drug development & registration**» (Razrabotka i registraciâ lekarstvennyh sredstv) is an up-to-date quarterly free application publication and information portal for Professionals involved in the circulation of medicines. Journal is designed for pharmaceutical manufacturers and their employees from the departments of development, quality control, registration, production and development; employees of laboratory centers, contract research organizations, scientific and educational institutions. The main focus of the journal is to summarize scientific and practical achievements in the field of drug development and registration, to increase the scientific and practical qualifications of specialists in the field of drug circulation. The main **five thematic sections** of the journal «Drug development & registration» (Razrabotka i registraciâ lekarstvennyh sredstv) include the development lifecycle of a drug product from its creation to obtaining a marketing authorization. The **first** section is devoted to the research and development of new medicines, the **second** one provides information about pharmaceutical technology, pharmaceutical ingredients, and equipment for drug development. The **third** section describes analytical quality control methods; the **fourth** section is devoted to approaches to evaluating the efficacy and safety of medicines, conducting clinical and preclinical studies. The **fifth** section deals with the validation of methods, preparation of the registration dossier, the life cycle of the drug product in the GxP environment. Journal accepts for consideration both review and original papers. Both domestic and foreign researchers in the field of drug development and registration are invited to publication in the journal.

Editorial board

Editor-in-Chief

Igor E. Shohin, Dr. of Sci. (Pharm.), CEO in LLC Center of Pharmaceutical Analytics (ООО Center of Pharmaceutical Analytics/ООО «СРФА»), Moscow, Russia

Editorial board

Yulia I. Ammour, Cand. of Sci. (Biol.), Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Sera of RAMS, Moscow, Russia

Mikhail V. Belousov, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Boyan R. Calija, as. Prof., PhD (Serbia), University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Ivan A. Vasilenko, Prof., Dr. of Sci. (Chem.), RUDN University, Moscow, Russia

Olga E. Vaizova, as. Prof., Dr. of Sci., Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Ivan A. Vartanants, Prof., Cand. of Sci., Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg, Germany

Konstantin S. Guzev, Retinoid Company, Dr. of Sci. (Pharm.), Moscow, Russia

Dmitriy A. Gusarov, MIREA – Russian Technological University (RTU MIREA), Dr. of Sci. (Chem.), Moscow, Russia

Natalia B. Diomina, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Svetlana V. Emshanova, Dr. of Sci. (Pharm.), RUDN University, Moscow, Russia

Elena I. Kalenikova, Prof., Dr. of Sci., Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Timofey N. Komarov, Cand. of Sci. (Chem.), Center of Pharmaceutical Analytics, Moscow, Russia

Julia I. Kulnich, Cand. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Oleg G. Makeev, Prof., Dr. of Sci. (Med.), The Central Research Laboratory of the Ural Medical University, Yekaterinburg, Russia

Evgeniya A. Malashenko, Cand. of Sci. Pharm., Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Yury V. Medvedev, Cand. of Sci. (Pharm.), Center of Pharmaceutical Analytics, Moscow, Russia

Evgeny S. Melnikov, Cand. of Sci. (Pharm.), FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Igor I. Miroshnichenko, Dr. of Sci., Federal State Budget Scientific Institution «Scientific Center of Mental Health», Moscow, Russia

Rouslan I. Moustafine, Cand. of Sci. (Pharm.), Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan

Natalia A. Oborotova, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

Vladimir V. Popov, Prof., Dr. of Sci. (Med.), Joint Stock Company «Russian Railways», Moscow, Russia

Русинов В. Л., чл. корр. РАН, д.х.н., директор Химико-технологического института ФГАОУ ВО УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

Скорик Ю. А., доц., к.х.н., руководитель лаборатории природных полимеров Института высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

Сливкин А. И., проф., д.фарм.н., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Смехова И. Е., профессор кафедры технологии лекарственных форм. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

Станисhevский Я. М., д.х.н., проф., директор Института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ РУДН, Москва, Россия

Сукоян Г. В., д.б.н., Международный центр внедрения новых биомедицинских технологий, Тбилисский государственный университет имени Ивана Джавахишвили, Тбилиси, Грузия

Сысueв Б. Б., доц., д.фарм.н., ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Ташлицкий В. Н., к.х.н., старший научный сотрудник кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Тринева О. В., д.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Хуторянский В. В., к.х.н., Prof., BSc MSc PhD MRSC, School of Pharmacy, University of Reading, Реддинг, Великобритания

Чучалин В. С., д.фарм.н., заведующий кафедрой фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

Эпштейн Н. А., к.х.н., зав. лабораторией Центра регистрации и разработки лекарственных средств ООО «Ирвин 2», Москва, Россия

Учредители печатной версии

Общество с ограниченной ответственностью
«Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)
Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования Первый Московский
государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова

Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет)
Адрес: 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

Учредители онлайн версии

Общество с ограниченной ответственностью
«Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)
Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Издатель

Общество с ограниченной ответственностью
«Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)
Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Директор журнала
Кульджанова Н. В.

Заведующий редакцией
Михайлова Н. С.

Дата выхода в свет журнала: ноябрь 2012 г.

Журнал выходит с периодичностью 4 раза в год

Адрес редакции
Россия, 117246, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3. Тел.: +7 (499) 281-81-11
www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru

Отпечатано в типографии
ООО «МАКС ПРЕСС», Россия, 141092, Московская область, г. Королев,
микрорайон Юбилейный, ул. Парковая, д. 2, кв. 103

**Журнал зарегистрирован в Российском индексе
научного цитирования (РИНЦ)**

Свидетельство о регистрации:
СМИ ЭЛ № ФС77-75437 от 01.04.2019 выдано Федеральной службой
по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых
коммуникаций

Префикс DOI: 10.33380/2305-2066

Тираж 999 экземпляров

Условия распространения материалов:
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License

Свободная цена

Vladimir L. Rusinov, RAS c.-m., Dr. of Sci. (Chem.), Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

Yury A. Skorik, Cand. of Sci. (Chem.), Institute of Macromolecular Compounds, Saint-Petersburg, Russia

Aleksei I. Slivkin, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia

Irina E. Smekhova, Dr. of Sci. (Pharm.), Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

Yaroslav M. Stanishevskiy, Prof., Dr. of Sci. (Chem.), RUDN University, Moscow, Russia

Galina V. Sukoyan, Dr. of Sci. (Biol.) (Georgia), International Centre of Introduction of New Biomedical Technology, Tbilisi, Georgia

Boris B. Sysuev, as. Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Vadim N. Tashlitsky, Cand. of Sci. (Chem.), Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Olga V. Trineeva, Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia

Vitaliy V. Khutoryanskiy, Prof., Dr. of Sci. (Chem.) (UK), University of Reading, Reading, United Kingdom

Vladimir S. Chuchalin, Dr. of Sci. (Pharm.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Naum A. Epshtein, Cand. of Sci. (Chem.), Irvin-2 Company, Moscow, Russia

Print version founders

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
(Sechenov University)

Address: 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

Siberian State Medical University

Address: 2, Moscovskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia

Online version founders

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

Publisher

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

Journal director

Natalia V. Kuldjanova

Managing Editor

Nadezhda S. Mikhaylova

Date of publication of the magazine: November 2012

The journal is published at intervals of 4 times a year

Editorial office address

20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia. Tel.: +7 (499) 281-81-11
www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru

Printing office

LLC «MAX PRESS», 2/103, Parkovaya str., Yubileyny microdistrict, Korolev,
Moscow region, 141092, Russia

Journal is registered in Russian index of scientific citation

Registration certificate:

EL Media No. FS77-75437 dated 01.04.2019 issued by the Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications, Information Technologies and Mass Communications

DOI prefix: 10.33380 / 2305-2066

Circulation: 999 copies

Content distribution terms:

Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License

Free Price

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Содержание

Contents

От редакции	6	Introduction
Практические рекомендации	7	Practical recommendations
Мероприятия	21	Events
Раздел «Поиск и разработка новых лекарственных средств»		«Research and development of new drug products» part
А. В. Сыроешкин, Т. Е. Елизарова, Т. В. Плетенёва, Е. В. Успенская, О. В. Левицкая, И. А. Злацкий, Т. В. Максимова	24	Anton V. Syroeshkin, Tatyana E. Elizarova, Tatyana V. Pleteneva, Elena V. Uspenskaya, Iga V. Levitskaya, Igor A. Zlatkiy, Tatyana V. Maksimova
Влияние дейтерия на свойства фармацевтических субстанций (обзор)		The Influence of Deuterium on the Properties of Pharmaceutical Substances (Review)
К. Д. Скоринова, В. В. Кузьменко, И. А. Василенко	33	Kristina D. Skorinova, Valeriya V. Kuzmenko, Ivan A. Vasilenko
Перспектива создания лекарственных препаратов на основе наночастиц селена (обзор)		The Prospect of Creating Medicines Based on Selenium Nanoparticles (Review)
Раздел «Фармацевтическая технология»		«Pharmaceutical Technology» part
Ю. Ю. Загорулко, Е. Ю. Загорулко	45	Yury Y. Zagorulko, Elena Y. Zagorulko
Особенности растворов гиалуроновой кислоты для внутрисуставного введения и современные тенденции в их разработке (обзор)		Features of Hyaluronic Acid Solutions for Intra-articular Introduction and Recent Trends in Their Development (Review)
Е. И. Савельева	56	Elena I. Savelieva
Современные технологии модифицированного высвобождения биологически активных веществ в фармацевтической разработке (обзор)		Modern Technologies of Controlled Release of Biologically Active Substances in Pharmaceutical Research and Development (Review)
С. И. Косенкова, И. И. Краснюк, И. И. Краснюк (мл), А. В. Беляцкая, О. И. Степанова, Е. В. Мазяркин, Т. В. Корочкина, Ю. Я. Харитонов	67	Svetlana I. Kosenkova, Ivan I. Krasnyuk, Ivan I. Krasnyuk (jr.), Anastasia V. Belyatskaya, Olga I. Stepanova, Egor V. Mazyarkin, Tatyana V. Korochkina, Yuriy Ya. Kharitonov
Изучение стабильности вязкого раствора нафтифина гидрохлорида с комбинацией полиэтиленгликолей для наружного применения		Study of the Stability of a Viscous Solution of Naftifin Hydrochloride with a Combination of Polyethylene Glycols for External Use
Д. С. Гордеева, А. В. Ситенкова (Буховец), Р. И. Мустафин	72	Daria S. Gordeeva, Aleksandra V. Sitenkova (Bukhovets), Rouslan I. Moustafine
Интерполиэлектролитные комплексы на основе сополимеров Eudragit® как носители для систем биоадгезивной гастроретентивной доставки метронидазола		Interpolyelectrolyte Complexes Based on Eudragit® Copolymers as Carriers for Bioadhesive Gastroretentive Metronidazole Delivery System
Е. В. Флисюк, С. С. Белокуров, И. А. Наркевич, А. Н. Шиков, О. М. Флисюк, Д. Ю. Ивкин	77	Elena V. Flisyuk, Sergey S. Belokurov, Igor A. Narkevich, Alexander N. Shikov, Oleg M. Flisyuk, Dmitry Yu. Ivkin
Кинетика экстрагирования диосцина из растительного сырья в виброкавитационном гомогенизаторе		Kinetics of Extraction of Dioscine from Vegetable Raw Materials in Vibrocavitation Homogenizer
Р. И. Мустафин, В. В. Будников, С. Г. Абдуллина, Ш. Ф. Насибуллин, Р. А. Салеев	83	Rouslan I. Moustafine, Vitaliy V. Budnikov, Svetlana G. Abdullina, Shamil F. Nasibullin, Renat A. Saleev
Поликомплексный носитель для трансбуккальной мукоадгезивной доставки метронидазола		Polycomplex Carrier for Buccal Mucoadhesion Delivery of Metronidazole
Раздел «Методы анализа лекарственных средств»		«Analytical Methods» part
О. В. Тринеева	91	Olga V. Trineeva
Сравнительная характеристика определения сахаров различными методами в листьях крапивы двудомной		Comparative Characteristics of Sugar Determination by Different Methods in Leaves of Nettle

- Ю. М. Домнина, В. В. Суслов, С. А. Кедик,
Е. В. Ворфоломеева, А. В. Мелешко
- Количественное определение налтрексона гидрохлорида
в назальном спрее методом высокоэффективной жидкостной
хроматографии
- Д. И. Писарев, О. О. Новиков, Е. Т. Жиликова,
Н. Н. Бойко, Р. А. Абрамович, О. Г. Потанина,
С. Лазар, А. Сайед Ахмад, Р. Нассер
- Разработка состава и технологии гранулированной
лекарственной формы на основе густого экстракта
расторопши пятнистой и адеметионина
- Т. С. Ковшова, Н. С. Осипова, А. С. Фортуна,
Ю. В. Ермоленко, О. О. Максименко, В. Ю. Балабаньян,
С. Э. Гельперина
- Оптимизация методов оценки степени включения
доксорубицина в наночастицы на основе сополимера
молочной и гликолевой кислот (PLGA)
- Раздел «Доклинические и клинические исследования»**
- Е. А. Ежова, И. Г. Котельникова, А. В. Тетенева,
Д. В. Бутузова, К. Ф. Тетенев
- Изучение параметров фармакокинетики препарата морфин
гидрохлорид, таблетки пролонгированного действия
у онкологических пациентов с хроническим болевым
синдромом сильной интенсивности
- А. Ю. Майоров, И. А. Федотов, Р. В. Драй,
О. И. Авдеева, И. Е. Макаренко
- Результаты оценки биоподобия препаратов РинЛиз®
(ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и Хумалог®
(«Лилли Франс», Франция) с использованием метода
гиперинсулинемического эугликемического клэмп
на здоровых добровольцах
- Т. Н. Комаров, И. Е. Шохин, О. А. Мискив,
Д. С. Богданова, А. В. Алешина, Ю. В. Медведев,
Н. С. Багаева
- Разработка и валидация методики количественного
определения валганцикловира и его метаболита
ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ
- Ю. В. Медведев, М. А. Колганова, О. А. Сас,
Т. Н. Комаров, Е. Н. Фишер, И. Е. Шохин,
Ю. И. Амму
- Оценка иммуногенности препаратов пэгфилграстима
у пациентов с диагнозом «рак молочной железы»
- И. Е. Шохин, Н. С. Багаева, Е. А. Малашенко,
В. Н. Кузина
- Оценка Методы оценки эквивалентности профилей
растворения: современный взгляд (обзор)
- Раздел «Регуляторные вопросы»**
- В. А. Орлов, В. Н. Шестаков
- Оценка взаимосвязи между отклонениями
от требований GMP и потенциальными дефектами
качества лекарственной продукции: результаты опроса
уполномоченных лиц
- 98 Yuliya M. Domnina, Vasilii V. Suslov, Stanislav A. Kedik,
Elena V. Vorfolomeeva, Anastasiya V. Meleshko
- Quantitative Determination of Naltrexone Hydrochloride
in a Nasal Spray by High-performance Liquid
Chromatography
- 106 Dmitry I. Pisarev, Oleg O. Novikov, Elena T. Zhilyakova,
Nikolay N. Boyko, Rimma A. Abramovich, Olga G. Potanina,
Simon Lazar, Abdulrazak Sayed Ahmad, Raudas Nasser
- Development of the Composition and Technology
of a Granular Dosage form Based on a Thick Milk Thistle Extract
and Ademetonine
- 113 Tatyana S. Kovshova, Nadezhda S. Osipova, Anastasiya S. Fortuna,
Yulia V. Ermolenko, Olga O. Maksimenko, Vadim Yu. Balabanyan,
Svetlana E. Gelperina
- Optimization of Methods for Determination of the Encapsulation
Efficiency of Doxorubicin in the Nanoparticles Based
on Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)
- «Preclinical and clinical study» part**
- 119 Ekaterina A. Ezhova, Inna G. Kotelnikova, Anna V. Teteneva,
Daria V. Butuzova, Konstantin F. Tetenev
- The Study of Pharmacokinetics Parameters
of Morphine Hydrochloride, Long-acting Tablets
in Cancer Patients with Severe Chronic Pain
Syndrome
- 124 Alexander Yu. Mayorov, Ivan A. Fedotov, Roman V. Drai,
Olga I. Avdeeva, Igor E. Makarenko
- Results of the Estimation of Biosimilarity of RinLiz®
(LLC «GEROPHARM», Russia) and Humalog®
(Lilly France, France) Using the Method
of the Hyperinsulinemic Eulglycemic Clamp
on Healthy Voluntary
- 133 Timofey N. Komarov, Igor E. Shohin, Olga A. Miskiv,
Dana S. Bogdanova, Alexandra V. Aleshina, Yuri V. Medvedev,
Natalia S. Bagaeva
- Development and Validation of Valganciclovir
and its Active Metabolite Ganciclovir Determination
in Human Plasma by HPLC-UV Method
- 140 Yuri V. Medvedev, Maria A. Kolganova, Olga A. Sas,
Timofey N. Komarov, Elizaveta N. Fisher, Igor E. Shohin,
Yulia I. Ammour
- Immunogenicity Assessment of Pegfilgrastim in Patients
with Breast Cancer
- 145 Igor E. Shohin, Natalia S. Bagaeva, Evgeniya A. Malashenko,
Vera N. Kuzina
- Method of Estimating the Equivalence of Dissolution Profiles:
a Modern View (Review)
- «Regulatory Issues» part**
- 151 Vladimir A. Orlov, Vladislav N. Shestakov
- Assessing the Correlation Between GMP Deviations
and Potential Quality Defects of Medicinal Products:
the Result of the Survey of Qualified
Persons

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!



Главный редактор журнала И. Е. Шохин

В непростое время пандемии COVID-19 журнал продолжает свою работу по освещению тематики поиска и разработки новых лекарственных средств, фармацевтической технологии, фармацевтического анализа, доклинических и клинических исследований, а также регуляторных вопросов. С момента выхода предыдущего выпуска в работе журнала произошел ряд значимых событий

Научно-производственный журнал **«Разработка и регистрация лекарственных средств»** (издатель – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики») успешно прошел экспертизу и был рекомендован комиссией Scopus Content Selection and Advisory Board для включения в международную базу данных Scopus. Эксперты комиссии отдельно отметили высокий уровень публикаций журнала, значимость издания для российского рынка, а также дали рекомендации о важности подготовки полностью переводной английской версии для повышения международной цитируемости. В ближайшее время после одобрения издания будет проведена выгрузка последних выпусков в базу и их индексация, так что скоро читатели смогут увидеть свои публикации уже непосредственно в Scopus. Кроме того, журнал был включен и проиндексирован в DOAJ (Directory of Open Access Journals). Данная база включает в себя только реальные, высококачественные рецензируемые журналы открытого доступа.



Одобрение издания для принятия журнала в базу Scopus является большим прорывом и результатом работы всего коллектива редакции и редколлегии. Кроме того, включение журнала в Scopus должно повысить стандарты публикаций и получить международную узнаваемость и цитируемость издания: рецензирование станет более строгим и ответственным, а качество статей – более высоким. Дальнейшими этапами работы по развитию издания будут расширение редакционной коллегии и включение в её состав ведущих отечественных и иностранных специалистов из научных, учебных организаций и фармацевтических предприятий.



Центр Фармацевтической Аналитики, помимо издательской деятельности, в период самоизоляции и в настоящее время продолжает выполнять свою важную миссию – исследования в области разработки и контроля инновационных и воспроизведенных лекарственных средств, что является крайне актуальным с учетом действующих государственных программ развития фармацевтической промышленности и текущей пандемической ситуации. Для своевременного проведения исследований, необходимых отечественной фармацевтической промышленности, Центр перешел на сменную работу, включая ночные смены и выходные дни. Надеемся, что мы сможем тем самым внести свой посильный вклад в развитие Российской фармацевтической отрасли.

Желаем авторам издания, членам редакционной коллегии и читателям преодолеть это трудное для всех время, сохранять здоровье и беречь себя.



ЧТО В ДЕЙСТВИТЕЛЬНОСТИ ОБОЗНАЧАЕТ ЭКСПЛУАТАЦИОННАЯ КВАЛИФИКАЦИЯ?

АВТОРЫ

Dr. R. D. McDowall,
R. D. McDowall Limited, UK
(Великобритания);

P. A. Smith
Agilent Technologies, Inc.

ВВЕДЕНИЕ

Общая фармакопейная статья <1058> Фармакопеи США, касающаяся квалификации аналитических приборов (AIQ), вступила в действие в 2008 году и в течение девяти лет не редактировалась. В 2017 году в статью <1058> были внесены две поправки. Эти две поправки сильно повлияли на порядок квалификации аналитических приборов, а так как Фармакопея США – это единственная значимая фармакопея со статьей, посвященной такой квалификации, то поправки в статью <1058> имеют мировое значение.

Чтобы помочь сертифицированным лабораториям полностью соответствовать требованиям статьи <1058> в редакции 2017 года, компания Agilent выпустила четыре информационных доклада консультанта по соответствию Боба МакДоуэла (Bob McDowall), который участвовал в разработке статьи <1058>. Эта серия включает в себя следующие доклады:

1. «Что изменилось в статье <1058> Фармакопеи США в редакции 2017 года?» [1].
2. «Как соответствовать требованиям статьи <1058> Фармакопеи США в редакции 2017 года» [2].
3. «Роль квалификации аналитического оборудования в целостности данных согласно статье <1058> Фармакопеи США в редакции 2017 года» [3].
4. «Что такое эксплуатационная квалификация согласно статье <1058> Фармакопеи США в редакции 2017 года?» [4].

Изменения, внесенные в версию 2017 года общей статьи [5], рассматривались в первой технической документации этой серии: «Что изменилось в статье <1058> Фармакопеи США в новой редакции 2017 года?» [1]. В настоящей технической документации мы

рассмотрим влияние этих изменений на наименее понятную фазу модели четырех квалификаций – эксплуатационную квалификацию (PQ).

ЭВОЛЮЦИЯ МОДЕЛИ ЧЕТЫРЕХ КВАЛИФИКАЦИЙ: ВЛИЯНИЕ РЕДАКЦИИ СТАТЬИ <1058> ФАРМАКОПЕИ США В РЕДАКЦИИ 2017 ГОДА

Обе версии статьи <1058> Фармакопеи США 2008 и 2017 годов содержат модель четырех квалификаций для квалификации аналитических приборов и валидации ПО [например, стадии квалификация проекта (DQ), инсталляционной квалификации (IQ), функциональной квалификации (OQ) и эксплуатационной квалификации (PQ)]. Если учтена необходимость разработать пользовательскую спецификацию (URS) и разъяснить роли функциональной и эксплуатационной квалификации в процессе квалификации аналитического оборудования, то имеет место модель жизненного цикла, показанная на рисунке 1.

Таким образом, демонстрируется связь между стадиями квалификации приборов, и жизненный цикл испытания прибора может рассматриваться как модель валидации между стадиями квалификации проекта, инсталляционной квалификации и функциональной квалификации (см. рисунок 1).

Основным отличием от статьи <1058> версии 2017 года является то, что стадия эксплуатационной квалификации соответствует двум различным требованиям в жизненном цикле квалификации аналитического оборудования:

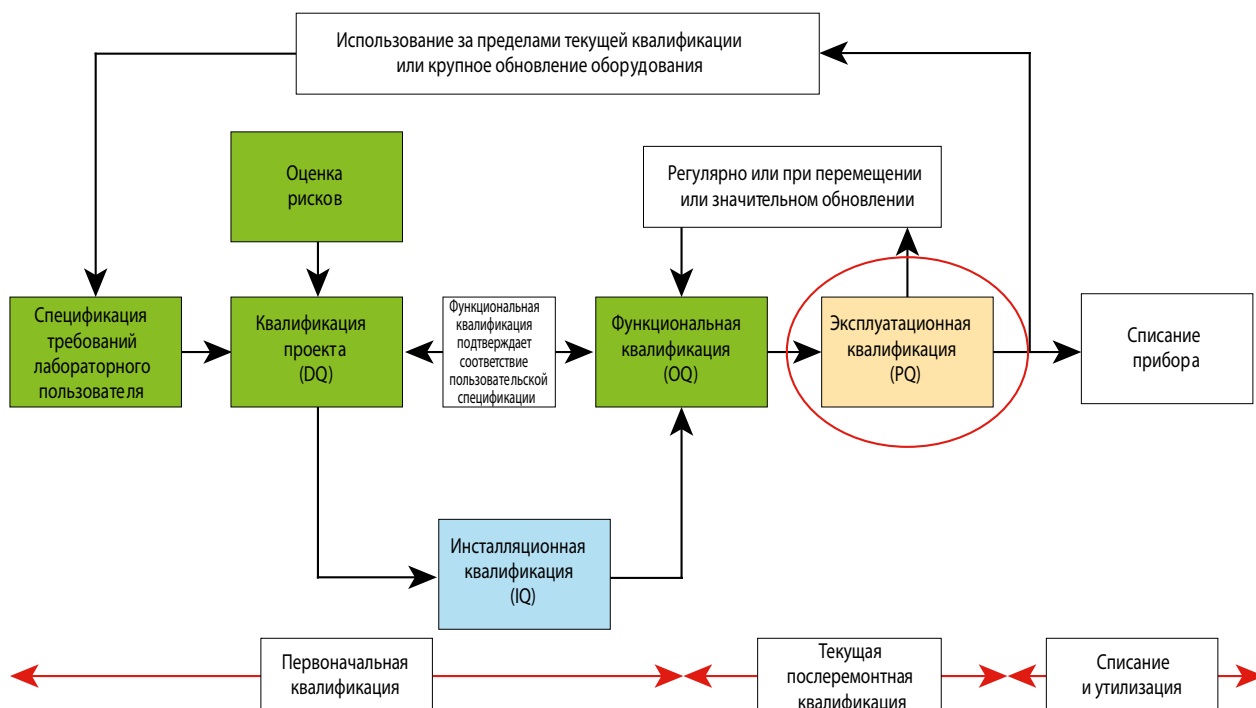


Рисунок 1. Модель четырех квалификаций в виде модели валидации

Figure 1. Model of four qualifications as a validation model

- **подтверждает**, что прибор подходит для применения в условиях использования;
- **демонстрирует** продолжительную пригодность прибора (надежную работу).

Первое требование выполняется посредством включения испытаний эксплуатационной квалификации во время исходной квалификации/выпуска прибора и последующего испытания квалификации прибора (например, периодического испытания функциональной и эксплуатационной квалификации или при наличии обоснованной причины). Несмотря на то что выполнение второго требования является чрезвычайно важным для успешной реализации положений статьи <1058> редакции 2017 года, пользователи должны определить планы испытаний эксплуатационной квалификации, включающие периодические испытания эксплуатационной квалификации между периодической квалификацией и квалификацией при наличии обоснованной причины. Испытание эксплуатационной квалификации не должно более рассматриваться как выполнение аналитического метода в системе. Поэтому даже после выпуска для эксплуатации фаза эксплуатационной квалификации распространяется на весь срок использования прибора. Это обведено кругом на рисунке 1.

Когда квалификация аналитических приборов только начала применяться в соответствии с руководством FDA для валидации производственного процесса [6] в отношении лабораторных инструментов, обычно ее выполняли перед исходным «вводом при-

бора в работу» (то есть квалификация аналитических приборов воспринималась как разовое мероприятие). Теперь пришло понимание, что квалификация аналитических приборов представляет собой динамический процесс, который должен выполняться в течение всего срока эксплуатации оборудования. Одним из существенных изменений в статье <1058> редакции 2017 года является демонстрация динамической связи между способами использования и испытания прибора (например, между пользовательской спецификацией и испытаниями функциональной, и эксплуатационной квалификации).

ЧТО В СТАТЬЕ <1058> ФАРМАКОПЕИ США ГОВОРИТСЯ ОБ ЭКСПЛУАТАЦИОННОЙ КВАЛИФИКАЦИИ?

Давайте начнем с того, что обратим внимание на формулировку статьи <1058> Фармакопеи США версии 2017 года, где эксплуатационная квалификация [5] определяется следующим образом:

«Эксплуатационная квалификация представляет собой задокументированную **совокупность действий**, призванных показать, что оборудование непрерывно демонстрирует рабочие характеристики, соответствующие **спецификациям, разработанным эксплуатирующей организацией**, и подходит для использования по назначению».

Это определение отличается от определения эксплуатационной квалификации, приведенного в

статье <1058> Фармакопеи США 2008 года, где теперь определена адаптация эксплуатационной квалификации к лабораторным требованиям, указанным в пользовательской спецификации к прибору. Одной из проблем, связанных с эксплуатационной квалификацией, является то, что лишь немногие знают, что это значит. Например, большинство ученых-аналитиков связывают эксплуатационную квалификацию с тестированием пригодности системы (SST) для аналитических приборов.

Причина, по которой неверно определять эксплуатационную квалификацию как тестирование пригодности системы, состоит в том, что квалификация аналитического прибора является специфической для прибора, а тестирование пригодности системы – специфическим для методики:

«Эксплуатационная квалификация удостоверяет, что прибор пригоден для определенной цели в реальных условиях его эксплуатации. После выполнения инсталляционной и функциональной квалификации продолжительная пригодность прибора для предусмотренного применения демонстрируется посредством постоянной эксплуатационной квалификации» [5].

Основополагающий вопрос, который возникает у сотрудников многих лабораторий в отношении аналитических приборов и статьи <1058> редакции 2017 года, состоит в следующем: может ли тестирование пригодности системы заменить эксплуатационную квалификацию?

Ответ содержится в следующем параграфе статьи <1058> Фармакопеи США:

«Планы эксплуатационной квалификации, включая процедуры испытаний, критерии пригодности системы и промежуток между квалификациями, определяются пользователем. Планы профилактического технического обслуживания и документация по ремонтным работам и прочим изменениям также являются неотъемлемой частью общей квалификации прибора».

В таблице 1 представлены наиболее распространенные подходы к обеспечению соответствия требованиям к испытаниям эксплуатационной квалификации для приборов ВЭЖХ.

Аналогичные подходы к трем вариантам в таблице используются в отношении всех аналитических приборов. Каждый из трех вариантов имеет очевидные преимущества и недостатки. Например, единственным существенным недостатком варианта 1 является риск того, что этот подход может быть отклонен в процессе аудита, тогда как вариант 3 требует для реализации большого объема ресурсов. Использование комплексной методики эксплуатационной квалификации (вариант 2) имеет преимущество, состоящее в том, что производительность каждого из приборов может оцениваться одним и тем же способом, в результате чего образуются tautology.

Таблица 1. Пример применения эксплуатационной квалификации для оборудования для ВЭЖХ

Table 1. Example application of operational qualifications for HPLC equipment

Применение эксплуатационной квалификации прибора		Комментарии/наблюдения
1	PQ = тестирование пригодности системы (SST) (например, PQ = SST)	<ul style="list-style-type: none"> Действительность SST включена в каждую методику? SST являются специфичными для методики. Аудитор может не принять интерпретацию
2	PQ = комплексная методика PQ + SST (например, одна и та же PQ используется для всех ВЭЖХ)	<ul style="list-style-type: none"> Упрощает требования PQ. Дополняет SST в процессе использования. Обосновывает, что испытание PQ является репрезентативным по отношению к применению
3	PQ = специфичная для PQ методика + SST (например, PQ является специфичной для прибора/способа использования)	<ul style="list-style-type: none"> Усложняет требования PQ в отношении лаборатории (например, специфичные и различные требования PQ для каждой системы ВЭЖХ). Дополняет SST в процессе использования. Приборы, закрепленные за конкретными методиками

Разъяснение требований эксплуатационной квалификации в статье <1058> редакции 2017 года указывает на то, что эксплуатационная квалификация представляет собой не одно мероприятие, а комплекс запланированных испытаний (с заданными значениями частоты и критериями применимости), мероприятий по техническому обслуживанию и проверок в эксплуатации, согласно записям в журналах приборов, о чем будет сказано ниже. Решение полагаться исключительно на тестирование пригодности системы приводит к слабой реализации эксплуатационной квалификации в хроматографических системах. Если в вашей лаборатории эксплуатационная квалификация определяется как результаты тестирования пригодности системы, а аудитор или инспектор усомнится в такой интерпретации, что вы будете делать?

УСТАНОВЛЕНИЕ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬСКОЙ СПЕЦИФИКАЦИЕЙ, ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ КВАЛИФИКАЦИЕЙ И ЭКСПЛУАТАЦИОННОЙ КВАЛИФИКАЦИЕЙ

Исходя из приведенного ранее определения эксплуатационной квалификации из статьи <1058> Фармакопеи США 2017 года, испытание эксплуатационной квалификации должно соотноситься с требованиями пользователя. Проблема состоит в том, что в ходе функциональной квалификации обычно тестируются требования пользователя непосредственно с приме-

нением прослеживаемых эталонов, метрологических измерений с использованием калиброванного оборудования и с применением эталонных материалов, разработанных для тестирования производительности оборудования и диапазона использования.

И наоборот, в основе эксплуатационной квалификации обычно лежат области применения и методики (например, при функциональной и эксплуатационной квалификации испытываются различные атрибуты производительности системы, поэтому требуются обе эти квалификации):

- **Функциональная квалификация:** Связана с испытаниями производительности оборудования в стандартизованных условиях, что позволяет демонстрировать правильную эксплуатацию оборудования в лаборатории в соответствии с пользовательской спецификацией. Например, в случае ВЭЖХ точность и воспроизводимость скорости потока могут измеряться непосредственно как метрологические измерения с помощью калиброванного и прослеживаемого цифрового расходомера. Диапазон использования (например, максимальные и минимальные настройки) измеряется в фазе функциональной квалификации.
- **Эксплуатационная квалификация:** Описывает пригодность прибора при фактических условиях использования между повторами цикла функциональной/эксплуатационной квалификации. Посредством эксплуатационной квалификации косвенным образом измеряются требования пользователя лаборатории. Например, точность и воспроизводимость скорости потока могут измеряться косвенным образом в эксплуатационной квалификации с помощью интервалов времени удерживания и ОСО (%) времени удерживания. Поскольку диапазон использования измеряется в фазе функциональной квалификации, нет необходимости измерять его в эксплуатационной квалификации.

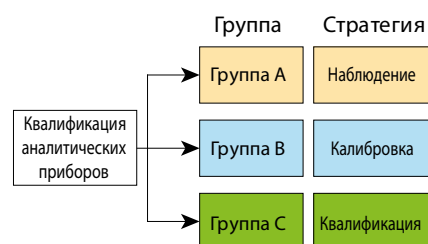
Основная проблема состоит в том, что должна иметься пользовательская спецификация, на которой будут основываться испытания эксплуатационной (и функциональной) квалификации.

Самым ранним опубликованным нормативом по квалификации аналитических приборов является статья 1994 года авторов Фурман и др. (Furman; et al.) [7] из FDA, включающая сравнительный анализ модульной и комплексной квалификации хроматографических приборов. Аргумент состоял в том, что, если производительность каждого модуля или компонента находится в допустимых пределах, в принципе, система может потенциально выйти из строя из-за добавления ошибок системных компонентов, не работающих должным образом вместе. Авторы предлагали добавление общей системы или комплексного теста в квалификацию аналитических приборов, поскольку тестирование модулей по отдельности будет недостаточно для обнаружения проблемы.

Комплексный тест эксплуатационной квалификации, выполненный после функциональной квалификации или даже в ее рамках, станет связующим звеном между функциональной и эксплуатационной квалификациями на основе методик, как показано на рисунке 3.

СЛОЖНОСТЬ ПРИБОРОВ И ТРЕБОВАНИЯ К ЭКСПЛУАТАЦИОННОЙ КВАЛИФИКАЦИИ

Статья <1058> Фармакопеи США включает три группы сложности приборов, причем классификация зависит от сложности прибора и его использования. Обычно стратегия испытания соответствия прибора для трех групп состоит в следующем:



Первый вопрос, который следует задать, состоит в следующем: каково влияние классификации А, В или С на требования к эксплуатационной квалификации?

Группа А: Мониторинг аппаратов (например, испарителя азота или мерной стеклянной посуды) осуществляется посредством наблюдения и не требует пользовательской калибровки.

Группа А – требования к испытаниям эксплуатационной квалификации. При условии, что наблюдение за успешной эксплуатацией выполняется в условиях использования и имеется типовый регламент испытаний, связанный с использованием аппарата группы А, дополнительные требования к испытаниям эксплуатационной квалификации отсутствуют. Для мерной стеклянной посуды, например, в типовом регламенте испытаний будет указано «осмотреть перед использованием» и избавиться от всей неподходящей стеклянной посуды (например, поврежденной или с обитыми краями).

Поэтому для группы А (аппараты) не требуется испытаний функциональной и эксплуатационной квалификации, но это решение необходимо задокументировать согласно принятой в лаборатории процедуре.

Группы В и С включают в себя более сложные приборы. Посредством статьи <1058> версии 2008 года лаборатории могли определить группу прибора, сверившись с примерами, представленными в статье <1058> редакции 2008 года, но отсутствующими в статье <1058> редакции 2017 года. Лаборатории теперь должны применять использования, чтобы определить, относится ли прибор к группе В или С.

Также важно понимать, что соответствие статье <1058> редакции 2017 года отличается динамичностью:

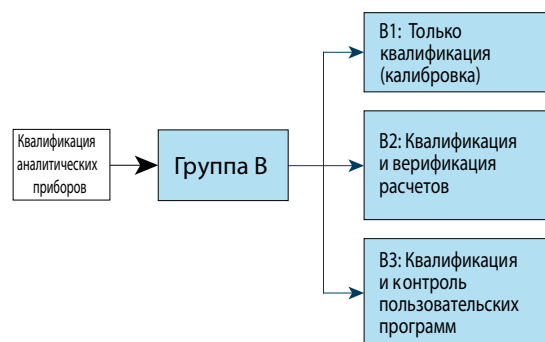
- **Более одной категории:** прибор может относиться к более чем одной категории из статьи <1058> (А, В или С) в зависимости от применения/целевого использования.
- **Смена области использования:** может изменить классификационную группу (А, В или С в статье <1058>).
- **Смена области использования:** приведет к изменению пользовательской спецификации и может изменить диапазон использования и требования к квалификации.

Например, ультразвуковая ванна иногда используется при пробоподготовке для растворения пробы. Нуждаясь в подтверждении (посредством оценки рисков), она обычно относится к группе А, что подтверждается наблюдением в процессе использования. Однако если ультразвуковая ванна включает нагреватель или таймер, классификация на группы может быть изменена. Если эти функции используются, то это будет выявлено в результате оценки рисков, и классификация изменится на группу В. Таймер и регулятор температуры должны калиброваться относительно диапазона использования на основе типового регламента испытаний. Если эти функции не используются, то им не требуется калибровка (например, потому что их использование не указано в процедуре). Маловероятно, что использование этих некалиброванных функций может физически или электронно контролироваться, тогда как лаборатории предотвратить их использование? Если они будут использоваться, то это будет означать использование некалиброванных приборов (например, кто-то использует регулятор температуры, когда он не прошел калибровку). Соответствие обычно достигалось посредством маркировки состояния прибора (например, в отсутствие калибровки температуры и таймера запрещается использовать приборы для видов работ, требующих обеспечения нормативного соответствия), обучения и документирования в типовом регламенте испытаний применения прибора. Однако подобный процедурный контроль не будет бессрочно считаться приемлемым, что повлияет на требования пользователя к приборам, которые будут закупаться в будущем (все приборы должны будут конструироваться для удовлетворения требований целостности данных без процедурного контроля).

Оценка рисков также выявит, включает ли прошивку прибора группы В следующее:

- **Расчеты:** встроенные расчеты (если они используются).
- **Пользовательские программы:** возможность создавать пользовательские программы.

Для приборов группы В оценка рисков приведет к следующей дополнительной подклассификации:



Дополнительные требования к подгруппам В2 и В3 связаны с испытанием ПО (см. техническую документацию 2: «Как соответствовать требованиям статьи <1058> Фармакопеи США в редакции 2017 года?» [2]). Основным способом документирования успешной эксплуатации прибора группы В (вместо испытания ПО) для пользователя является калибровка прибора в соответствии с типовым регламентом испытаний. В зависимости от сложности прибора также могут выполняться эксплуатационные и верификационные/квалификационные испытания лицами, не связанными с лабораторией (например, поставщиком услуг или отделом метрологии):

1. **Калибровка пользователем:** выполняется в рамках лаборатории.
2. **Внешнее техническое обслуживание/калибровка/квалификация:** выполняется лицом, независимым от лаборатории.

Одна из проблем, связанных с квалификацией аналитических приборов, состоит в том, что лабораториями и регулирующими органами может использоваться различная терминология [8]. В статье <1058> Фармакопеи США используется калибровка (для приборов группы В) и квалификация (для приборов группы С), тогда как в Своде федеральных законоположений (CFR) применяется слово «калибровка» (например, 21 CFR 211.68 (a), 211.160 (b)4 и 211.194(d)).

Для приборов группы В ответ на вопрос «Каковы требования к испытаниям эксплуатационной квалификации?» зависит от ответа на следующий вопрос:

«Отличается ли рутинное использование прибора от приведенных выше пунктов 1 и 2?»

Если ответ на этот вопрос **отрицательный**, то дополнительные требования к испытаниям, специфичные для эксплуатационной квалификации, которые необходимо включить в план испытаний эксплуатационной квалификации, отсутствуют.

Срок службы оборудования, используемого в лаборатории, должен определять/обосновывать, насколько выполненные испытания удовлетворяют требованиям функциональной и эксплуатационной квалификации, представленным в статье <1058> редакции 2017 года. В случае эксплуатационной квалификации это должно включать уточнение планов испытаний эксплуатационной квалификации, планов испытаний, критериев применимости и частоты испытаний. Традиционно эксплуатационная квалифи-

кация рассматривается исключительно как протокол испытаний эксплуатационной квалификации. Обеспечение соответствия этому требованию является задачей лаборатории.

На рисунке 2 представлена взаимосвязь между пользовательской спецификацией, функциональной и эксплуатационной квалификациями для простых приборов группы В. Для простых приборов (например, рН-метра) ежедневная калибровка или калибровка по месту использования является единственным выполняемым испытанием. Прямоугольник с цветовым переходом указывает на тот факт, что эта калибровка соответствует требованиям к испытаниям как функциональной, так и эксплуатационной квалификации. Для более сложных приборов группы В (например, аналитические весы) выполняются два вида калибровки инструментов:

- Внешняя калибровка отделом метрологии или поставщиком услуг испытывает диапазон использования и требования к функциональной квалификации.
- Калибровка, выполняемая пользователем, удовлетворяет требованиям к испытаниям эксплуатационной квалификации.

В обоих случаях имеются нормативы, в соответствии с которыми лаборатории должны выполнять периодические проверки производительности оборудования (например, регистрацию калибровок).

Для приборов группы С оценка рисков приведет к дополнительной подклассификации.

Что касается более сложных приборов группы С, например ВЭЖХ, то тут имеется косвенная связь между испытаниями эксплуатационной и функциональной квалификации, а также пользовательской спецификацией, поскольку испытание включает этап разделения, основанный на методике, как показано на рисунке 3.

ОЦЕНКА РИСКОВ СИСТЕМЫ ВЭЖХ: ЕСЛИ СИСТЕМА ОТКАЖЕТ, БУДЕТ ЛИ ЭТО ОБНАРУЖЕНО?

Прагматичным, но ориентированным на риск альтернативным способом оценки всего жизненного цикла квалификации аналитических приборов для оборудования является принятие во внимание следующего:

- **Отказ:** как может отказать прибор?
- **Детектирование:** будет ли обнаружен отказ посредством жизненного цикла/стратегии квалификации аналитического прибора?

Это фундаментальные вопросы по оценке рисков, которые можно задать в отношении любого аналитического прибора. Однако для систем ВЭЖХ на рисунке 4 представлены некоторые из наиболее распространенных путей отказа системы. Прибор представлен в виде четырех основных модулей с распространенными неисправностями. Это неполный список (например, некоторые из неисправностей могут классифицироваться и более точно), кроме того, не учитывается колонка, так как основной задачей в данном случае является оценка квалификации прибора.

Заключение, которое можно сделать исходя из исходной публикации [9], состоит в том, что большинство из этих неисправностей будут обнаружены в процессе функциональной квалификации, но для обнаружения некоторых других возможных вариантов выхода из строя оборудования потребуется внедрение тестирования пригодности системы. На рисунке 4 голубым шрифтом выделены режимы выхода из строя оборудования, которые могут быть обнаружены посредством должным образом разработанного комплексного испытания прибора (эксплуатационной квалификации).



Рисунок 2. Связь между эксплуатационной квалификацией, лабораторной пользовательской спецификацией и функциональной квалификацией для приборов группы В

Figure 2. Relationship between operational qualification, laboratory user specification and functional qualification for group B devices

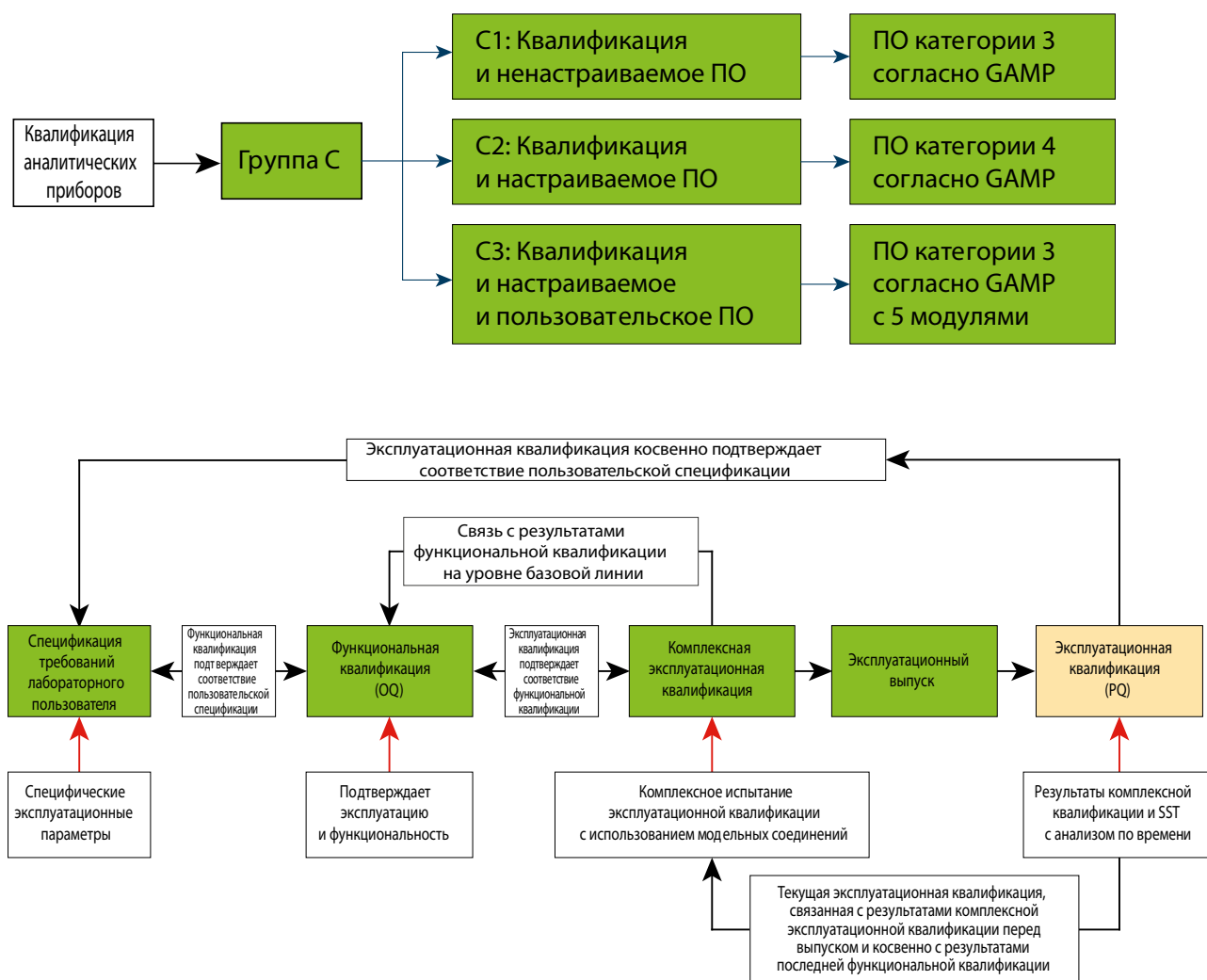


Рисунок 3. Связь между эксплуатационной квалификацией, лабораторной пользовательской спецификацией и функциональной квалификацией для сложных приборов

Figure 3. Relationship between operational qualification, laboratory user specification, and functional qualification for complex instruments

Важно понять, что этот вид анализа недостатков (по сравнению с тем, как может произойти отказ прибора и каким образом неисправность будет обнаружена посредством функциональной квалификации и тестирования пригодности системы) дол-

жен выполняться только один раз для каждого вида приборов. Таким образом, упрощается выполнение оценки влияния в случае поломки прибора или отказа квалификации (потому что риски уже оценены).

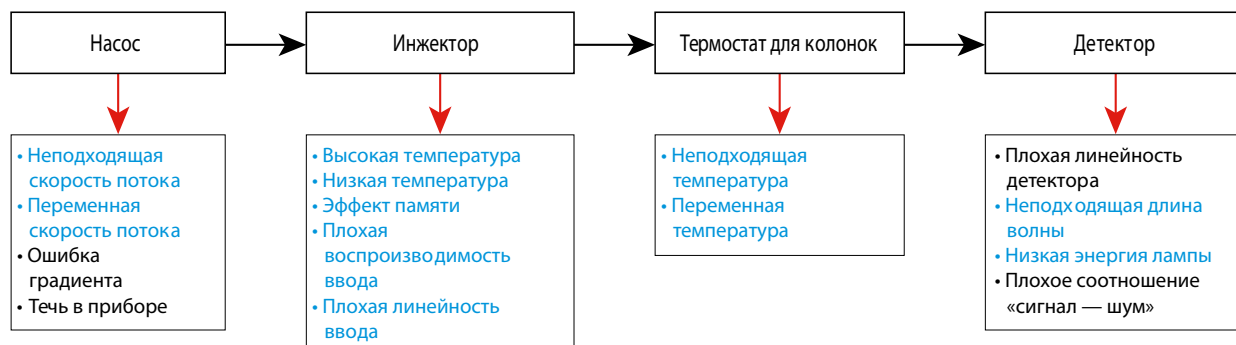


Рисунок 4. Возможные неисправности оборудования ВЭЖХ

Figure 4. Possible failures of HPLC equipment

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ОБ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЭКСПЛУАТАЦИОННОЙ КВАЛИФИКАЦИИ

Общая область применения плана эксплуатационной квалификации, представленная на рисунке 5, складывается из разъяснений по эксплуатационной квалификации, представленных в статье <1058> Фармакопеи США, изложенной ранее в настоящей технической документации. Эксплуатационная квалификация должна включать следующие основные элементы:

- **План эксплуатационной квалификации**, включающий весь объем мероприятий эксплуатационной квалификации.

Обычно составляется единый план, охватывающий вид приборов (например, оборудование для ВЭЖХ). План должен включать обоснование избранного подхода.

- **Процедуры испытаний эксплуатационной квалификации** с критерием применимости.
- **Частота** выполнения испытаний.

Помимо этого должны иметь место такие мероприятия, как рутинный анализ, ремонтные работы, регламентно-профилактическое обслуживание и записи в журнале технического обслуживания и использования оборудования. Из этих рассуждений должно

быть очевидно, что эксплуатационная квалификация включает в себя не только выполнение тестирования пригодности хроматографической системы для каждой выборки образцов.

ЧАСТОТА ИСПЫТАНИЙ ЭКСПЛУАТАЦИОННОЙ КВАЛИФИКАЦИИ

Для хроматографического анализа после функциональной квалификации рекомендуется выполнить комплексную эксплуатационную квалификацию, либо ее следует включить в функциональную квалификацию, чтобы связать пользовательскую спецификацию с функциональной квалификацией и обозначить оставшийся объем эксплуатационной квалификации. В лаборатории необходимо определить частоту испытаний эксплуатационной квалификации и интегрировать ее в цикл регулярной функциональной квалификации и регламентно-профилактического обслуживания. Например:

- регламентно-профилактическое обслуживание, выполняемое поставщиком услуг;
- ежегодная функциональная квалификация;
- комплексная эксплуатационная квалификация после функциональной квалификации;
- периодическая комплексная эксплуатационная квалификация;

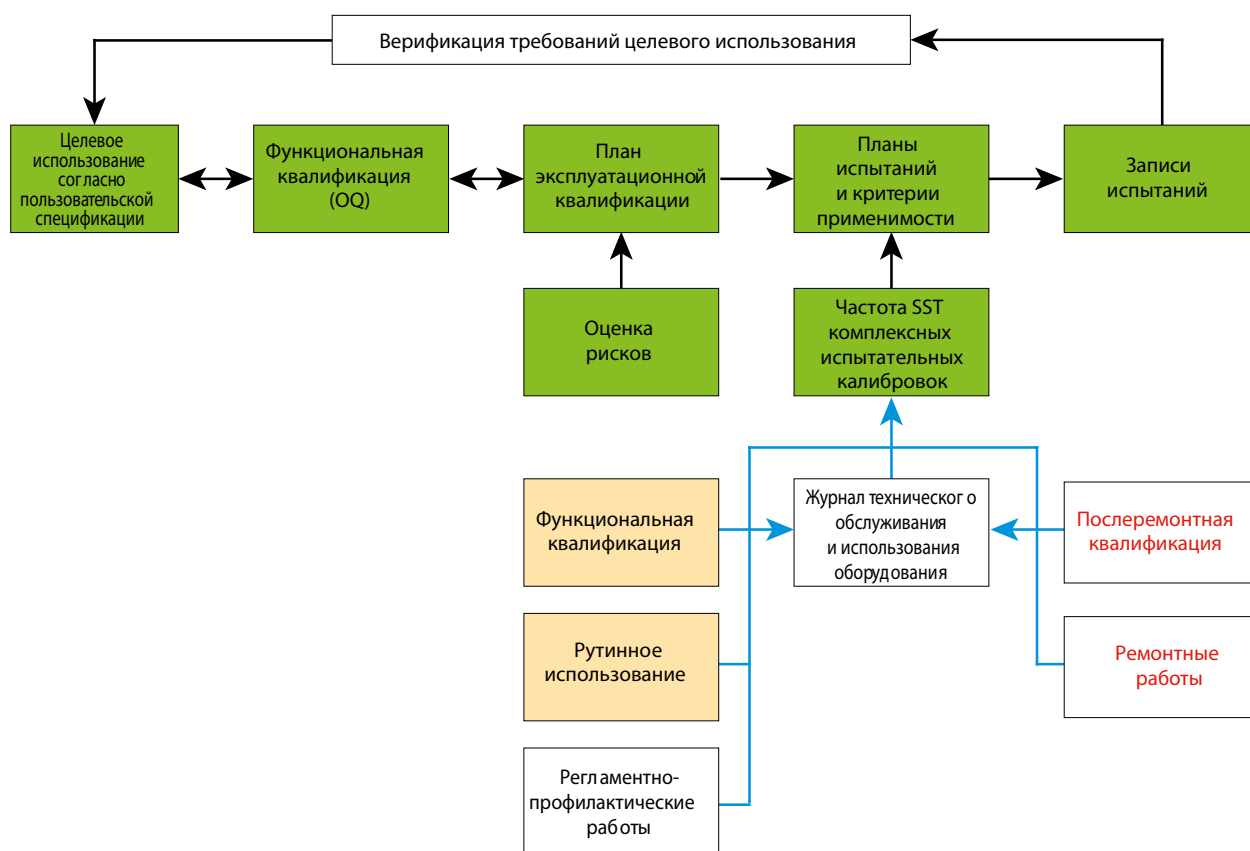


Рисунок 5. Область применения эксплуатационной квалификации для аналитического прибора

Figure 5. Scope of operational qualifications for the analytical instrument

- результаты тестирования пригодности системы, собираемые и анализируемые каждый раз при выполнении анализа для обеспечения соответствия требованиям пунктов 6.9 и 6.16 раздела 6 GMP EC и Руководства для промышленности FDA [10].

ЭКСПЛУАТАЦИОННАЯ КВАЛИФИКАЦИЯ: СВЯЗЬ МЕЖДУ ЯРУСАМИ ТРЕУГОЛЬНИКА КАЧЕСТВА ДАННЫХ

Модифицированный треугольник качества данных из статьи <1058> Фармакопеи США представлен на рисунок 6. Следует обратить внимание, что нижний уровень треугольника, квалификация аналитических приборов, является специфичным для приборов, в ней используются прослеживаемые эталонные стандарты и калиброванное испытательное оборудование. Все оставшиеся ярусы являются специфичными для методики. Поэтому если для эксплуатационной квалификации необходимо использовать испытания методик, например тестирование пригодности системы и комплексные испытания, то они должны демонстрировать, что требования пользователя, заданные в лабораторной пользовательской спецификации, соблюдаются при выполнении каждого испытания.

Новый подход к разработке и валидации аналитических процедур (на основе подхода к жизненному циклу) с применением концепции «качество на этапе разработки» (QbD) лежит в основе нового проекта

общей главы <1220> Фармакопеи США, опубликованной на фармакопейном форуме [11]. Таким образом, обеспечивается структурированный подход к разработке и валидации аналитических процедур, включая определение критических параметров, мониторинг которых может осуществляться посредством тестирования пригодности системы во время рутинного использования. Этот подход поможет разработать подходящие критерии тестирования пригодности системы для мониторинга и анализа производительности оборудования и позволит получить более надежные аналитические методы.

Существенное преимущество интегрированного подхода функциональной и эксплуатационной квалификации, связанного с документированными требованиями к пользователю лаборатории, состоит в том, что его легко обосновать. Можно легко отследить связь обоснования квалификационных подходов функциональной и эксплуатационной квалификации с пользовательской спецификацией, а также выполнить оценку рисков и задокументировать ее результаты.

РОЛИ И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЭКСПЛУАТАЦИОННОЙ КВАЛИФИКАЦИИ

В таблице 2 представлены роли и ответственности лиц, принимающих участие в эксплуатационной квалификации.



Рисунок 6. Модифицированный треугольник качества данных из статьи <1058> Фармакопеи США

Figure 6. Modified triangle of data quality from article <1058> USP

Таблица 2. Роли и ответственность при выполнении эксплуатационной квалификации

Table 2. Roles and responsibilities in performing operational qualifications

Роль	Ответственность
Ответственный за технологический процесс	<ul style="list-style-type: none"> Несет ответственность за всю квалификацию прибора. Оценивает и согласовывает план испытаний функциональной квалификации (или делегирует эту обязанность ответственному лицу в компании). Оценивает и согласовывает план испытаний эксплуатационной квалификации и процедуры испытаний
Эксперты в соответствующих областях	<ul style="list-style-type: none"> Записывают требования пользователей для прибора (и ПО). Оценивают и согласовывают план испытаний функциональной квалификации. Записывают план эксплуатационной квалификации и процедуры испытаний. Определяют научно безопасные критерии применимости испытания эксплуатационной квалификации, связанные с производительностью методики. Выполняют и документируют испытания эксплуатационной квалификации
Обеспечение качества	<ul style="list-style-type: none"> Согласовывает спецификацию требований пользователя. Согласовывает план испытаний эксплуатационной квалификации и процедуры испытаний. Периодически оценивает данные испытаний эксплуатационной квалификации и результаты испытаний
Инженер по квалификации	<ul style="list-style-type: none"> Выполняет и документирует регламентно-профилактическое обслуживание прибора и ремонтные работы. Выполняет и документирует функциональную квалификацию через определенные интервалы. Может выполнять комплексные испытания эксплуатационной квалификации в случае наличия соответствующего договора и необходимой тренировки

Примечание. Данные ответственности и роли изложены в руководстве.

Note. These responsibilities and roles are outlined in the manual.

Большинство задач связаны с работой в лаборатории. В принципе организации вне лаборатории, например, поставщик услуг или отдел метрологии, могут выполнить комплексное испытание эксплуатационной квалификации, но при этом регулирующий орган может выступить с возражением, что это не отражает в полной степени условий использования. В действительности обычно эксплуатационная квалификация входит в обязанности сотрудников лаборатории и должна выполняться ими. В случае если это выполняется сотрудниками лаборатории, лица, выполняющие работы, должны пройти соответствующее обучение по выполняемым испытаниям эксплуатационной квалификации.

Основная обязанность, представленная в таблице 2, состоит в том, что эксперты в соответствующих областях должны определить безопасный с научной

точки зрения критерий применимости испытания эксплуатационной квалификации. В основе научно безопасного подхода лежит установление связи между критерием применимости эксплуатационной квалификации, полученным при валидации методики, и эксплуатационными пределами, полученными из соответствующей общей главы Фармакопеи США. Например, для УФ-детектора для ВЭЖХ точность установки длины волны должна составлять ± 3 нм, а не ± 2 нм, в соответствии со статьей <621>, а не <857> Фармакопеи США.

ТЕСТИРОВАНИЕ ПРИГОДНОСТИ СИСТЕМЫ КАК ЧАСТЬ ЭКСПЛУАТАЦИОННОЙ КВАЛИФИКАЦИИ

Разработанное для обеспечения соответствия требованиям Фармакопеи, например, статьи <621> Фармакопеи США или п. 2.2.46 Европейской фармакопеи, тестирование пригодности системы играет важнейшую роль в документировании производительности хроматографической системы на уровне аналитического анализа. В данной ситуации естественным развитием событий будет рассмотреть, какой вклад тестирование пригодности системы может внести в план испытаний эксплуатационной квалификации.

Если результаты тестирования пригодности системы будут использоваться в рамках испытания эксплуатационной квалификации хроматографа, важно, чтобы соблюдались следующие условия:

Параметры **разработки методов** и критерии применимости определяются после разработки метода.

- Валидация метода** должна подтверждать пригодность тестирования пригодности системы для мониторинга производительности и обеспечивать прослеживаемость между валидацией метода и использованием тестирования пригодности системы. Это должно выполняться для мониторинга того, что прибор соответствует своим требованиям пользователя во время эксплуатации.
- Анализ параметров тестирования пригодности системы** в соответствии с требованиями GMP EC 6.9 и 6.16 и руководства для промышленности FDA [10]. Сводная информация по испытаниям методик станет частью общих критериев применимости эксплуатационной квалификации.

Многие лаборатории внедрили рациональные мероприятия, чтобы уменьшить объемы потенциально ненужной работы. Однако это должно гармонично сочетаться с научной безопасностью, согласно требованиям нормативов GMP, в частности, 21 CFR 211.160(b), например:

- Исключение ввода холостой пробы:** выполняется для экономии времени, но является ограничительным фактором при устранении неисправностей по причине отсутствия хроматограммы ввода подвижной фазы. Ввод холостой пробы позволит определить, имеет ли место эффект памяти из автосамплера, а также уровень флукуа-

ции/шума базовой линии в отклике детектора. Это может быть в свою очередь соотнесено с требованиями пользователя, как указывалось в этой технической документации.

- **Контрольные пробы:** аналогичные соображения необходимо принять во внимание для включения утвержденной и должным образом охарактеризованной контрольной пробы, особенно для характеристики примесей. Например, довольно распространенной в пострациональной *лаборатории*, применяющей хроматографические методики, является практика не включения стандарта, служащего в качестве компонента сравнения для анализа. Поскольку хроматография является сравнительной аналитической методикой, это может быть проблематичным.

В принципе, обоснование на основе риска применялось тогда, когда оценивались и сокращались надежные хроматографические методики. Проблема состоит в том, что использование рационально разработанных испытаний тестирования пригодности системы означает, что вероятен более высокий риск провала эксплуатационной квалификации и невозможность должным образом исследовать результаты, выходящие за рамки спецификации, или предоставить научное обоснование того, что выход из строя оборудования не повлиял на аналитические результаты (из-за отсутствия доказательств в зависимости от того, что выполняется в рамках тестирования пригодности системы).

На рисунке 4 представлены распространенные пути отказа системы ВЭЖХ. При эксплуатации некоторые из этих неисправностей могут быть и не обнаружены, в зависимости от того, как используется прибор (например, линии излучения лампы позволяют выполнить диагностическую проверку длины волны, когда включен детектор) и пределов, применимых к тестированию пригодности системы (например, интервалы времени удерживания).

Необходимо проявить осторожность при использовании проб для оценки производительности хроматографа, так как в последнем руководстве FDA [12] предлагается отказаться от ввода проб как средства испытания на соответствие. Все рабочие операции необходимо включать в документированные процедуры и оценивать полученные данные.

КОМПЛЕКСНОЕ ИСПЫТАНИЕ ЭКСПЛУАТАЦИОННОЙ КВАЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ВЭЖХ

В рамках общего подхода к эксплуатационной квалификации должно присутствовать комплексное испытание, которое может продемонстрировать, что по-прежнему обеспечивается соответствие требованиям пользователя. Рутинные аналитические процедуры должны быть как можно более надежными. Однако в основе надежного комплексного испытания лежит разработка аналитической процедуры, чувстви-

тельной к производительности оборудования (в противоположность обычной аналитической науке). Это подход, используемый для проверки корректности функционирования приборов для растворения, что обычно интерпретируется как эксплуатационная квалификация для этих приборов. В идеале в процедуре должны использоваться устойчивые модельные соединения, обеспечивающие простоту и стабильность выполнения хроматографического анализа, для минимизации аналитической изменчивости в зависимости от эталонного материала или использования. Выполнение процедуры зависит от производительности оборудования. Испытание выполняется при фактических условиях использования и в случае с оборудованием для ВЭЖХ состоит из следующего:

- **Два стабильных модельных соединения:** хорошо разделенные модельные соединения с предсказуемым поведением, имеющие хорошую форму пика при выполнении анализа в простой хроматографической системе.
- **Один и тот же максимум оптической плотности** в условиях испытаний, то есть они дают одинаковую площадь пиков при выполнении анализа в одном вводе.
- **Использование надежной хроматографической системы** с простой органической/водной подвижной фазой.
- **Аналитическая колонка:** использование относительно коротких аналитических колонок для сокращения времени анализа для общего испытания эксплуатационной квалификации.
- **Подготовка стандартов** в подвижной фазе для минимизации нестационарности при вводе.
- **Подготовка растворов эталонного вещества гравиметрически** во избежание ошибок пипетирования и минимизации общих различий методики.
- **Подготовка для использования четырех концентраций раствора** (25, 50, 75 и 100 %), содержащих два соединения для испытания воспроизводимости и линейности автосамплера и детектора.
- **Запуск последовательности:** состоит из холостой пробы, вводимой один раз в начале последовательности и в конце каждого стандартного набора.
- **Ввод каждого стандарта** шесть раз.

Эти общие комплексные стандарты обеспечивают установку пределов для следующего:

- воспроизводимость и линейность детектора;
- воспроизводимость автосамплера;
- сочетание системы насосов и управления термостатированием колонки.

Все параметры измеряются прибором в фактических условиях работы системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день существует множество различных интерпретаций того, что должны содержать квалификация аналитических приборов и эксплуатационная квалификация. Версия статьи <1058> Фарма-

копей США 2017 года дает разъяснения в отношении требований к квалификации аналитических приборов, а также пояснения различий между фазами функциональной и эксплуатационной квалификации. Однако являясь методическим документом, статья <1058> не может предписывать необходимые испытания в каждом случае, и обязанностью сотрудников лаборатории остается документация соответствия квалификации аналитических приборов требованиям статьи <1058>. Обычно эксплуатационная квалификация представляет собой область квалификации аналитических приборов, где возможна более широкая интерпретация, и в технической документации даются пояснения по требованиям эксплуатационной квалификации. Для поддержки эксплуатационной квалификации и более глубокого понимания требований квалификации аналитических приборов в таблице 2 приложения настоящей технической документации приводятся некоторые из наиболее часто задаваемых вопросов, связанных с требованиями квалификации аналитических приборов и эксплуатационной квалификации. Изменения, реализованные в статье <1058> Фармакопеи США редакции 2017 года, и указания на эти изменения должны быть приняты к сведению лабораториями, иначе возникнет риск несоответствия нормативам.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. What Has Changed with the 2017 Version of USP <1058>. *Agilent Technologies White Paper*. 2018; 5991–9418EN.
2. How to Comply with the 2017 Version of USP <1058>. *Agilent Technologies White Paper*. 2018; 5991–9419EN.
3. The Role of Analytical Instrument Qualification in Data Integrity with the 2017 Version of USP <1058>. *Agilent Technologies White Paper*. 2018; 5991–9420EN.
4. What Does Performance Qualification Really Mean with the 2017 Version of USP <1058>? *Agilent Technologies White Paper*. 2018; 5991–9421EN.
5. General Pharmacopoeia article of the United States Pharmacopoeia on the qualification of analytical equipment, <1058>, USP 40-NF 35 up to the 2nd application. Available at: <https://hmc.usp.org/about/general-chapters> (in Russ.).
6. FDA Guidance for Industry. Guidelines on General Principles of Process Validation. 1987.
7. Furman W. B. et al. Validation of Computerized Liquid Chromatographic Systems. *J. AOAC Int.* 1994; 77: 1314–1318.
8. Smith P. Compliance in Regulated Laboratories. *American Laboratory*. 2015.
9. Smith P., McDowall R. D. Life Cycle Risk Assessment of HPLC Instruments. *LC-GC Europe*. 2015.
10. FDA Guidance for Industry. Analytical Procedures and Method Validation for Drugs and Biologics. 2015. Available at: [ucm386366](https://www.fda.gov/oc/ohrt/ucm386366).
11. Stimuli to the Revision Process. New general chapter: The Analytical Procedure Life Cycle <1220>. Pharmacopoeia Forum, PF 43 (1), January – February 2017.
12. FDA Guidance for Industry «Data Integrity and Compliance with cGMP». April 2016.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

ТАБЛИЦА ЧАСТО ЗАДАВАЕМЫХ ВОПРОСОВ ПО ЭКСПЛУАТАЦИОННОЙ КВАЛИФИКАЦИИ И КВАЛИФИКАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ ПРИБОРОВ

Вопрос	Ответ
Требуется ли выполнять квалификацию аналитических приборов для всех аналитических приборов?	Аналитические приборы, применяемые для принятия решений о качестве в регулируемых средах, например испытательных фармацевтических лабораториях, должны подходить для целевого использования. Без возможности продемонстрировать это аналитические результаты в ходе аудита могут быть признаны недействительными или сомнительными. Выполнение квалификации аналитических приборов – самый лучший способ решения этой проблемы. Лаборатории должны рассматривать и определять необходимый уровень квалификации для решений, принятых на основе аналитических результатов, а не обосновывать отсутствие необходимости в квалификации аналитических приборов. Риск, связанный с предоставлением любого обоснования для невыполнения задачи, состоит в том, что аудитор/регулирующий орган может полностью не согласиться с такой интерпретацией. В том случае, если требования квалификации аналитических приборов отличаются (например, между испытаниями для контроля и обеспечения качества и научно-исследовательскими лабораториями), важно определить соответствующие уровни квалификации аналитических приборов для различных типов лабораторий и в дальнейшем работать с ними, а не применять универсальную интерпретацию (например, «квалификации аналитических приборов не требуется для выполнения аналитических задач в лаборатории «х», потому что...»)
Могу я проигнорировать статью <1058> Фармакопеи США, потому что моя компания не занимается экспортом в США?	Соответствие требованиям Фармакопеи США является обязательным для материалов, поставляемых в США. Поэтому, в принципе, компания, которая не занимается поставками в США, не обязана обеспечивать соответствие. Однако аудиты и инспекции часто связаны с обеспечением соответствия стандартам, а Фармакопея США является единственной крупной фармакопеей, включающей раздел, посвященный квалификации аналитических приборов. Она имеет влияние за пределами США. Статья <1058> Фармакопеи США представляет собой ценный норматив для квалификации аналитических приборов, отличающийся простотой по сравнению с другими нормативами, например, GAMP (надлежащая автоматизированная производственная практика) (например, семь страниц по сравнению с 352 страницами в GAMP 5). Таким образом, информация, содержащаяся в статье <1058>, имеет обширное влияние и должна рассматриваться в качестве сведений о наилучших подходах и нормативах

Вопрос	Ответ
Что требуется включить в оценку рисков квалификации аналитических приборов?	<p>Выполнение оценки рисков теперь является неотъемлемой частью нормативных требований статьи <1058> Фармакопеи США. Для обеспечения единообразия выполнения оценки рисков эта процедура должна быть определена и задокументирована.</p> <p>Процедура должна включать три этапа:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Определение принадлежности прибора к группе А, В или С (в зависимости от целевого использования). • Документация соответствия всех приборов пользовательской спецификации. • Для приборов группы В определение следующего: <ul style="list-style-type: none"> • Необходимо проверить, используются ли встроенные расчеты. • Необходимо проверить, используются ли пользовательские программы. • Для приборов группы С определить категоризацию GAMP: <ul style="list-style-type: none"> • Группа 3, группа 4 или группа 5. • Проверка на соответствие области применения при испытаниях и согласно пользовательской спецификации, либо обоснование применения
Существуют ли регуляторные предписания для лабораторий, не выполняющих квалификацию аналитических приборов?	<p>Да. Несмотря на то что в последние годы в лабораторных аудитах и надзорных проверках решающую роль играла целостность данных, появляется все больше сведений о том, что аудиторы продолжают уделять существенное внимание лабораторным операциям, включая квалификацию аналитических приборов. В техническую документацию части 3 из этой серии входит таблица примеров наблюдений несоответствия нормативам из предупреждающих писем FDA, FDA 483s и базы данных EudraGMDP (европейский эквивалент предупреждающим письмам FDA). См. техническую документацию части 3 в источниках литературы</p>
Почему необходимо составить спецификацию требований пользователя?	<p>Пользовательская спецификация (URS) не была упомянута в статье <1058> версии 2008 года. Однако необходимость документировать пользовательскую спецификацию является фундаментальным требованием статьи <1058> редакции 2017 года, где утверждается, что квалификация аналитических приборов и валидация ПО не могут выполняться без разработки пользовательской спецификации</p>
Требуется ли выполнять и функциональную, и эксплуатационную квалификации для аналитических приборов?	<p>Необходимо задокументировать тот факт, что квалификация аналитических приборов удовлетворяет требованиям статьи <1058> редакции 2017 года. Так как функциональная и эксплуатационная квалификации отвечают за испытания различных атрибутов производительности оборудования, то требуются обе квалификации. Детализация конкретных требований функциональной квалификации и эксплуатационной квалификации зависит от аналитической технологии/сложности прибора и взаимосвязи между способом испытания прибора и условиями использования</p>
В чем состоит разница между функциональной и эксплуатационной квалификациями?	<p>Требования функциональной и эксплуатационной квалификации представлены в статье <1058> Фармакопеи США, но вкратце можно сформулировать следующее:</p> <p>Функциональная квалификация: проверка соответствия прибора требованиям пользователя и диапазону использования.</p> <p>Эксплуатационная квалификация: демонстрация продолжительной работы прибора в условиях использования</p>
Мои хроматографические методики включают тестирование пригодности системы (SST). Есть ли необходимость в отдельном выполнении эксплуатационной квалификации?	<p>Да. Так как тестирование пригодности системы является специфичными для методики, хотя оно и вносит вклад в документирование текущей производительности оборудования. Само по себе тестирование пригодности системы не считается полностью совместимым с требованиями эксплуатационной квалификации, изложенными в статье <1058> редакции 2017 года. Вам необходимо задокументировать, каким образом квалификация аналитических приборов соответствует требованиям эксплуатационной квалификации статьи <1058>, и иметь возможность успешно пояснить это во время аудита. Это означает два основных требования эксплуатационной квалификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Прибор пригоден для использования при испытаниях в условиях использования. • Испытана и задокументирована непрерывная работа прибора
Каковы риски, связанные с использованием тестирования пригодности системы в качестве эксплуатационной квалификации?	<p>Сложно провести количественное определение восприятия риска. Основные риски, связанные с аргументом SST = PQ, состоят в том, что аудитор может не согласиться с интерпретацией или с тем, что эта интерпретация соответствует статье <1058>. Фармакопеи США. Интегрированная, хорошо проработанная квалификация аналитических приборов и процессы жизненного цикла повышают качество полученных аналитических результатов и обеспечивают уверенное обоснование результатов (сокращая риск, связанный с аудитом)</p>
Является ли эксплуатационная квалификация в настоящий момент нормативным требованием?	<p>Да. Жизненный цикл четырех квалификаций аналитических приборов включает эксплуатационную квалификацию как требование. Так было всегда, но поправка в статье <1058> Фармакопеи США редакции 2017 года привлекла к этому большее внимание нормативных органов и внесла ясность в роли функциональной и эксплуатационной квалификации. Однако организации в своих внутренних регламентах должны указать, каким образом процессы квалификации аналитических приборов удовлетворяют требованиям статьи <1058> Фармакопеи США, включая требования функциональной и эксплуатационной квалификации</p>
Насколько часто следует выполнять эксплуатационную квалификацию?	<p>Пользователи несут ответственность за планы испытаний эксплуатационной квалификации. Поэтому на этот вопрос сложно дать однозначный ответ, пользователи должны сами определять частоту планов испытаний эксплуатационной квалификации</p>

Вопрос	Ответ
Кто несет ответственность за выполнение эксплуатационной квалификации?	Лаборатория несет ответственность за качество всех выполняемых квалификаций вне зависимости от того, кто занимается их выполнением. Пользователи должны определить планы испытаний эксплуатационной квалификации, но испытания могут выполняться сторонними группами при условии, что испытания согласованы пользователями и лица, выполняющие работы, имеют необходимую подготовку
Если пользователь (или поставщик услуг) проводит ремонтные работы, например замену уплотнений насоса ВЭЖХ или УФ-лампы детектора, какая требуется послеремонтная квалификация?	В случае выполнения ремонта прибора его работа должна быть продемонстрирована до начала использования для выполнения анализов. Это может быть полная квалификация или любая квалификация системных компонентов, связанных с ремонтом (послеремонтная квалификация, RQ). Для поддержки RQ должна иметься согласованная процедура, которая документирует необходимую квалификацию после ремонта прибора перед тем, как он будет возвращен в эксплуатацию. Например, замена уплотнений насоса в лаборатории не повлияет на работу детектора ВЭЖХ, а замена лампы не повлияет на работу насоса. Для всех ремонтных работ, задокументированных в процедуре, требуется либо полная квалификация, либо выполнение оценки рисков документа для обоснования требуемой послеремонтной квалификации
Где следует проводить испытания диапазона использования прибора?	Испытание рабочего диапазона используемого прибора является основным требованием по обеспечению соответствия для документирования пригодности к использованию, невыполнение которого приводит к наложению регуляторных предписаний на лабораторию. В рамках функциональной квалификации должна испытываться пользовательская спецификация. В случае если диапазон использования не прошел испытания, существует риск наложения регуляторных предписаний. В связи с этим риском в тех случаях, когда в рамках функциональной квалификации не выполняются испытания диапазона использования, лаборатория обычно выполняет дополнительную работу сверх функциональной квалификации. Легче адаптировать функциональную квалификацию таким образом, чтобы включить в нее диапазон использования там, где это возможно
Существуют ли риски соответствия, связанные с «горячей» заменой компонентов системы для сохранения ее функционирования?	Любые вносимые в прибор изменения должны выполняться при условии, что изменения задокументированы и согласованы (например, контроль изменений). Нормативы, используемые лабораторией для документирования и обоснования продолжительной пригодности и единообразной работы прибора, имеют большое значение. Для выполнения детальной оценки влияния (где исследуется потенциальное влияние выхода из строя оборудования на аналитические результаты) необходимо иметь соответствующую информацию о выходе из строя оборудования. Если в процессе работы лаборатории выполняются «горячие» замены, то последующая процедура должна включать детальное описание выполнения оценки влияния
Что необходимо, чтобы гарантировать соответствие квалификации аналитических приборов статье <1058>?	Квалификация аналитических приборов представляет собой требование для лабораторий. Обеспечение соответствия необходимой квалификации аналитических приборов представляет собой наилучший подход для всех аналитических лабораторий вне зависимости от отрасли. Необходимо: <ul style="list-style-type: none"> • понимать требования статьи <1058> и их интерпретацию; • выполнять анализ недостатков в соответствии со статьей <1058> редакции 2017 года и используемой квалификацией аналитических приборов; • проверять, что диапазон использования задокументирован и испытан при квалификации аналитических приборов; • ставить в приоритет выявление недостатков, в том числе определение планов испытаний эксплуатационной квалификации



Agilent

Trusted Answers

ДИЛЕММА РАЗВИТИЯ: САМОСТОЯТЕЛЬНЫЙ ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ ПУТЬ ИЛИ МЕЖДУНАРОДНАЯ КООПЕРАЦИЯ?

Пути и перспективы развития фармацевтической промышленности в России обсудили участники Международной конференции «INOPharma».



Международная конференция «INOPharma 2020» – одно из немногих мероприятий, которое состоялось, несмотря на эпидемиологическую ситуацию в мире (ВОЗ официально объявила о пандемии коронавируса). Мероприятие организовано компанией «Деловая Столица». Пленарное заседание начинается с глобальной темы: «Развитие российской фармацевтики: уникальный путь или международная кооперация?».

Формат дискуссий «вопрос-ответ» предполагал живое общение аудитории и спикеров. Первый заместитель министра промышленности и торговли РФ **Сергей Цыб** отметил, что итоговые показатели программы развития отрасли свидетельствуют о высоком потенциале российской фармы. Действительно, даже на первый взгляд цифры поражают: как отметил первый заместитель главы Минпромторга России **Сергей Цыб**, «итоговые показатели программы развития отрасли свидетельствуют о высоком потенциале российской фармы; всего на фармплощадках страны производится 1260 МНН, что соответствует 2880 торго-

вым наименованиям препаратов, рост производства лекарств за год превысил 26 %».

Ректор СПХФУ **Игорь Наркевич** в своем выступлении отметил, что «фармацевтическая промышленность и медицина стали тем щитом, который сможет защитить интересы страны и здоровье каждого гражданина России». О качестве российских лекарств доложили генеральный директор компании «Аван» **Елена Терешкова** и руководитель АО «Биннофарм» **Дмитрий Дрыкин**. Вопросы подготовки кадров в отрасли пластической хирургии осветила в своём выступлении **Наталья Мантурова**, главный внештатный специалист пластический хирург Министерства здравоохранения, заведующая кафедрой пластической и реконструктивной хирургии, косметологии и клеточных технологий Университета им. Н. И. Пирогова.

Возможности международной кооперации и трансфера технологий участникам конференции на примере работы своей компании презентовал **Дмитрий**



рий Кудлай, генеральный директор компании «Генериум».

На актуальные вопросы о производстве фармстанций и предложения по развитию этого направления в России на Пленарном заседании ответили **Александр Семенов**, президент компании «Активный Компонент», и **Людмила Щербакова**, президент группы компаний Bright Way.

Заместитель генерального директора по стратегии и инвестициям «Нацимбио» (Ростех) **Никита Крестьянинов** в своём выступлении сообщил, что успешная стратегия по созданию инноваций в российской биофармацевтике представляет собой симбиоз развития собственных компетенций и привлечения иностранных технологий в тех случаях, когда это позволяет максимально оперативно достигать необходимых отечественному здравоохранению результатов. В качестве иллюстрации эффективности такой стратегии он рассказал о том, что за прошлый год «Нацимбио» зарегистрировала три вакцины собственной разработки и приступила к локализации производства ещё трех профилактических препаратов.

Всего на конференции прошло 9 сессий, на них обсудили следующие актуальные темы: реализацию Национального проекта «Здравоохранение», сроки появления в России первой ядерной аптеки, особенности отечественной и зарубежной регуляторики, инженерные практики в медицинской и фармацевтической сфере, реализацию проекта по персонализированной медицине, взаимодействие науки и бизнеса в отрасли и многое другое.

Международная консалтинговая компания Ernst & Young в рамках конференции «INOPharma» успешно провела сессию на тему: «Актуальные регуляторные тренды и автоматизация работы с ними в фармацевтической отрасли».

На конференции обсудили также одну из самых актуальных тем в публичном пространстве – врачебные ошибки. В ходе сессии были рассмотрены ключевые актуальные вопросы взаимоотношений врача и пациента, предложена уникальная «дорожная карта» по принятию спорных вопросов взаимодействия. Участники дискуссии рассмотрели конкретный кейс «история одной ошибки», допущенной из-за халатности и равнодушного отношения медперсо-

нала в многопрофильной клинике г. Санкт-Петербурга.

Генеральным партнёром конференции выступила компания Alium. Специальный партнёр конференции: Эллаб Рус. Партнёры конференции: Аван, Сан-Фарма Россия, Astellas, Нацимбио, PQE CIS, БИОН, LDV, ПРОМОМЕД ДМ Ассоциация Инфарма, Союз Профессionalных Фармацевтических Организаций (СПФО), Ассоциация фармацевтических производителей ЕАЭС. Интеллектуальным партнёром стало издательство «Альбина Паблишер».

Информационные партнёры: РБК Конференции, «Регионы России», «Фармацевтический вестник», «Столица Москва», Медианститут общественного здоровья, научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств», Аптечный союз, «Кто есть кто в медицине», «Фармация и Медицина», «Фармацевтические технологии и упаковка», Yellmed.



НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ



Медиа-партнерство



Наше издание приглашает к сотрудничеству специалистов и экспертов фармацевтического рынка, задействованных в сфере разработки и производства лекарственных средств, а также производителей сырья, материалов и оборудования, необходимого для оснащения лабораторных комплексов и производственных объектов.

В рамках информационного сотрудничества мы предлагаем:

➤ Публикации в печатном и электронном журнале

- Научные статьи
- Рекламные статьи
- Рекламные модули

➤ Баннерная реклама на сайте

Размещение рекламных баннеров на сайте
pharmjournal.ru

➤ Публикации статей, новостей, мероприятий на сайте журнала

➤ e-mail маркетинг (в базе 16500 адресов)

➤ Участие в качестве спикера/экспонента в конференциях, организуемых нашим изданием



О журнале

Разделы издания охватывают весь жизненный цикл лекарственного средства:

- ✓ Поиск и разработка новых лекарственных средств.
- ✓ Научные и практические направления от разработки и производства исходных фармацевтических ингредиентов, технологий и оборудования до создания стандартных и терапевтически эффективных ЛС.
- ✓ Аналитические методики контроля качества.
- ✓ Подходы к оценке эффективности и безопасности лекарственных средств, проведению доклинических и клинических исследований.
- ✓ Валидация методик, подготовка регистрационного досье, жизненный цикл лекарственного препарата в GxP-окружении.



Включен в перечень изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией.
Редакция ведет работу по включению журнала в список цитирования SCOPUS.

Научный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» является партнером ключевых мероприятий фармацевтической отрасли:



- ✓ Фармацевтический форум стран ЕАЭС и СНГ.
- ✓ Российский Фармацевтический Форум.
- ✓ GMP-конференция с международным участием.
- ✓ Дженирики и биосимиляры в России и ЕАЭС.
- ✓ IPhEB Russia.
- ✓ И других не менее значимых мероприятий.

**По вопросам информационного сотрудничества
просьба обращаться по электронной почте
info@pharmjournal.ru; pharmjournalru@gmail.com
или по телефону +7 977 781 86 18**

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-24-32>
УДК 615.1



Обзорная статья/Review article

Влияние дейтерия на свойства фармацевтических субстанций (обзор)

А. В. Сыроешкин¹, Т. Е. Елизарова¹, Т. В. Плетенёва^{1*}, Е. В. Успенская¹, О. В. Левицкая¹,
И. А. Злацкий^{1,2}, Т. В. Максимова¹

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
2 – ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», 04114, Украина, Киев, ул. Вышгородская, д. 67

*Контактное лицо: Плетенёва Татьяна Вадимовна. E-mail: tvplet@mail.ru

Статья получена: 25.02.2020. Статья принята к печати: 07.04.2020

Резюме

Введение. Обзор посвящен влиянию изотопа водорода – дейтерия на биологическую активность фармацевтических субстанций.

Текст. Рассмотрены два аспекта влияния дейтерия на свойства активных фармацевтических ингредиентов и вспомогательных веществ. Первый связан с использованием дейтерированных субстанций – новых соединений или полученных замещением протия в известных противоядных аналогах. Кинетический изотопный эффект (КИЭ), выражающийся в снижении скорости биотрансформации в результате дейтерирования, позволяет прогнозировать быстрое развитие нового направления в разработке лекарственных средств. При идентичном терапевтическом эффекте дейтерированные аналоги обеспечивают улучшение фармакокинетических характеристик, снижение токсичности, блокировку эпимеризации оптически активных субстанций, изменение механизмов биотрансформации. Второй аспект влияния дейтерия отражает возрастание КИЭ в процессах с участием известных фармацевтических субстанций в водных растворах с соотношением дейтерий/протий (D/H) ниже природного. Впервые на диаграмме «доза – ответ» показана идентичность дейтерия эссенциальным микроэлементам, когда недостаток и избыток элемента снижает жизнеспособность организма. Улучшенные кинетические характеристики продемонстрированы для молекулярного и организменного уровня разной иерархической градации. В частности, они заключаются в возможности увеличения скорости растворения субстанций, влияния на процессы мутаротации углеводов и оптическую активность хиральных субстанций, возрастание накопления эссенциальных элементов в лекарственных растениях и других процессах.

Заключение. Полученные результаты позволяют прогнозировать механизмы влияния дейтерия на биохимические превращения фармацевтических субстанций в организме.

Ключевые слова: дейтерированные фармацевтические субстанции, вода, обедненная по дейтерию, кинетический изотопный эффект дейтерия.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. А. В. Сыроешкин – автор идеи; теоретическая трактовка экспериментальных результатов исследования влияния изотопного состава на физико-химические свойства воды и биологическую активность субстанций в водах с разным соотношением D/H. Т. Е. Елизарова, Т. В. Плетенёва, Е. В. Успенская – подготовка обзора по механизмам действия дейтерированных субстанций. Е. В. Успенская, О. В. Левицкая, Т. В. Плетенёва – исследование скорости мутаротации углеводов, растворимости субстанций, оптической активности аминокислот в водах с разным соотношением D/H. И. А. Злацкий – исследование физико-химических свойств воды с разным соотношением D/H и влияние изотопного состава воды на культуры клеток. Т. В. Максимова – влияние изотопного состава воды на накопление микроэлементов лекарственными растениями.

Благодарность. Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100».

Для цитирования: Сыроешкин А. В., Елизарова Т. Е., Плетенёва Т. В., Успенская Е. В., Левицкая О. В., Злацкий И. А., Максимова Т. В. Влияние дейтерия на свойства фармацевтических субстанций. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 24–32.

The Influence of Deuterium on the Properties of Pharmaceutical Substances (Review)

Anton V. Syroeshkin¹, Tatyana E. Elizarova¹, Tatyana V. Pleteneva^{1*}, Elena V. Uspenskaya¹,
Olga V. Levitskaya¹, Igor A. Zlatskiy^{1,2}, Tatyana V. Maksimova¹

1 – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia
2 – State Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS of Ukraine, 67, Vyshgorodska str., Kyiv, 04114, Ukraine

*Corresponding author: Tatyana V. Pleteneva. E-mail: tvplet@mail.ru

Received: 25.02.2020. Accepted: 07.04.2020

Abstract

Introduction. The study discusses the hydrogen isotope ²H effect on the biological activity of pharmaceutical substances.

Text. Two aspects of the deuterium effect on the properties of active pharmaceutical ingredients and excipients are considered. The first one involves the use of deuterated substances, new compounds or substituted counterparts. Replacing protium with deuterium is used to reduce the rate of biotransformation. The kinetic isotope effect (KIE), expressed in a decrease in the rate of biotransformation as a result of deuteration, allows us to predict the rapid development of new directions in the development of pharmaceuticals. With the same therapeutic effect, an improvement in pharmacokinetic characteristics, a decrease in toxicity, a blocking of the epimerization of optically active substances, a change in the mechanisms of action are observed. The second aspect of the deuterium effect is associated with an increase in KIE of known pharmaceutical substances in aqueous solutions with a deuterium/protium ratio (D/H) lower than in natural water. For the first time, dose-response diagrams for deuterium demonstrate identity with essential microelements. There is a safety zone for the certain D/H relationship, beyond which the organism's vitality decreases. Improved

© Сыроешкин А. В., Елизарова Т. Е., Плетенёва Т. В., Успенская Е. В., Левицкая О. В., Злацкий И. А., Максимова Т. В., 2020

© Syroeshkin A. V., Elizarova T. E., Pleteneva T. V., Uspenskaya E. V., Levitskaya O. V., Zlatskiy I. A., Maksimova T. V., 2020

kinetic characteristics are demonstrated for molecular level and for biological objects of various hierarchical levels. In particular, they include the possibility of increasing the dissolution rate of substances, the influence on the processes of mutarotation and the optical activity of chiral substances, the degree of accumulation of necessary elements in medicinal plants, and other processes.

Conclusion. The results make it possible to predict the mechanisms of deuterium influence on the biochemical transformations of pharmaceutical substances in the body.

Keywords: deuterated drug candidates, deuterium depleted water, kinetic isotope effect of deuterium.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Anton V. Syroeshkin – the author of the idea; theoretical interpretation of the isotopic composition influence on the physicochemical properties of waters and the biological activity of substances in water with different D/H values. Tatyana E. Elizarova, Elena V. Uspenskaya – review on the mechanisms of action of deuterated substances. Elena V. Uspenskaya, Olga V. Levitskaya, Tatiana V. Pleteneva, – investigation of the carbohydrate mutarotation rate, solubility of substances, optical activity of amino acids in the waters with different D/H ratio. Igor A. Zlatsky – a study of the physicochemical properties of waters with different D/H ratio and the effect of the isotopic composition on cell cultures. Tatyana V. Maksimova – the effect of the water isotopic composition on the accumulation of essential microelements by medicinal plants.

Acknowledgment. The publication has been prepared with the support of the «RUDN University Program 5-100».

For citation: Syroeshkin A. V., Elizarova T. E., Pleteneva T. V., Uspenskaya E. V., Levitskaya O. V., Zlatskiy I. A., Maksimova T. V. The influence of deuterium on the properties of pharmaceutical substances. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 24–32.

ВВЕДЕНИЕ

Атом наиболее распространенного изотопа водорода – протия ^1H имеет один протон и один электрон. Дейтерий D (^2H) – более тяжелый природный изотоп водорода с атомной массой, равной 2, и в отличие от протия имеет один нейтрон в ядре атома. Дейтерий – нерадиоактивный стабильный изотоп водорода, постоянно присутствующий в природной воде ($\text{D}/\text{H} = 150$ ppm для московского региона) и в организме человека (в количествах, соизмеримых с содержанием таких эссенциальных микроэлементов, как цинк, медь, железо) [1, 2]. «Тяжелую» воду D_2O , не содержащую атомов протия H , используют в атомной энергетике в качестве замедлителя нейтронов в атомных реакторах.

Дейтерированные соединения находят применение в количественном анализе биологических материалов со сложной матрицей (например, кровь, моча или желчь) методами хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Дейтерированные аналоги определяемых соединений играют роль внутренних стандартов. Благодаря сходству физических и химических свойств аналит и внутренних стандартов обладают близкими характеристиками ионизации и временами удерживания. Некоторое различие в их молекулярных массах позволяет избежать перекрытия сигналов. Такой подход стал широко признанным биоаналитическим инструментом, позволяющим регистрировать содержание активных фармацевтических ингредиентов, вспомогательных веществ, продуктов их биотрансформации, а также метаболитов эндогенных соединений [3, 4].

Первые патенты на дейтерированные субстанции были выданы в США в середине прошлого века [5, 6]. Задачей разработок являлось получение субстанций с низкой скоростью биотрансформации вследствие большей прочности связи $\text{C}-\text{D}$ по сравнению с $\text{C}-\text{H}$. Это позволяло снизить дозу и минимизировать побочные эффекты предполагаемых лекарств [5].

В настоящее время накоплен значительный экспериментальный материал по влиянию соотношения дейтерий/протий (D/H) в воде на процессы с уча-

тием биологически активных субстанций *in vitro* и *in vivo* [1, 7–12]. Так установлено, что в интервале содержания дейтерия от 0,5 до 16 ммоль/л в «легкой» воде, (ddw – deuterium depleted water; вода, обедненная по дейтерию) возрастает кинетический изотопный эффект (КИЭ) биологически активных соединений [7, 11, 12]. В такой воде изменяются скорости растворения субстанций и мутаротации углеводов, оптические свойства хиральных соединений, возрастает всасывание и накопление ионов эссенциальных микроэлементов в лекарственных и пищевых растениях. Применение ddw в онкологии в качестве адъювантного средства сопровождается улучшением состояния пациентов [9, 10].

Как дефицит, так и избыток дейтерия в водной среде по сравнению с естественным содержанием ($\text{D}/\text{H} = 130\text{--}150$ ppm) оказывается пагубным для живых организмов. Это наглядно демонстрирует полученная авторами настоящего обзора трапецевидная экспериментальная кривая с использованием клеточного сенсора *S. ambigua* [7]. Она аналогична классической зависимости «доза/концентрация – ответ/эффект» для эссенциальных микроэлементов [2]. Влияние соотношения $[\text{D}]/[\text{H}]$ в водных растворах проявляется на различных иерархических уровнях. Обнаруженные кинетические эффекты растворимости субстанций, изменение скорости мутаротации углеводов, оптической активности аминокислот и аскорбиновой кислоты, энергии активации лиганд-рецепторных взаимодействий клеточных моделей – все свидетельствует о том, что дейтерий следует рассматривать как один из эссенциальных элементов. Биохимические превращения фармацевтических субстанций в организме могут протекать с участием молекул воды смешанного изотопного состава ($\text{H}-\text{O}-\text{D}$) с образованием дейтерированных продуктов биотрансформации. Влияние тяжелого изотопа водорода на метаболические процессы в живых организмах как компонента активного фармацевтического ингредиента или как компонента молекулы растворителя – предмет будущих научных изысканий. Подобная картина накопления сведений о ме-

ханизмах действия жизненно необходимых микроэлементов разворачивается на наших глазах, беря начало от пионерских работ В. И. Вернадского. В связи со сказанным нельзя не согласиться с автором работы [13], который приводит пример с атомом эссенциального микроэлемента – фтора. В 1970-х гг. фтор был компонентом лишь 2 % лекарств, тогда как в настоящее время его можно обнаружить в 25 % зарегистрированных лекарственных средств. Не исключено, что аналогичная «судьба» постигнет и атом дейтерия.

Цель настоящего обзора – обобщение сведений по влиянию соотношения дейтерий/протий в фармацевтических субстанциях и в водных растворах на объекты разного иерархического уровня.

ДЕЙТЕРИРОВАННЫЕ ЛЕКАРСТВА

Отличие дейтерия от протия с позиции фармацевтической химии

По сравнению с протиевыми субстанциями дейтерированные аналоги более устойчивы к окислению. Длина связи C–D короче на 0,005 Å по сравнению с C–H. Поскольку атом D имеет в 2 раза большую массу, чем H, энергия активации необходимая для достижения переходного состояния при разрыве связи больше для C–D, чем для C–H. Именно поэтому скорость реакции с участием дейтерированного соединения меньше, чем для его протиевого аналога ($k_H > k_D$). КИЭ, выражающийся как отношение констант скорости реакции протиевого и дейтерированного соединения k_H/k_D , обычно колеблется от 1 до 7, но может быть и выше [6]. Для дейтерий-модифицированных биоизостеров характерны неизменность биологической активности и оптимизация фармакокинетики.

В синтезе меченных дейтерием соединений могут быть использованы два основных подхода. Это обычный многоступенчатый синтез с использованием дейтерированных реагентов или дейтерирование родительского соединения методом H/D изотопного обмена [5]. Изотопный протий-дейтериевый обмен (H/D) зависит от pH и природы катализатора [3, 15].

Номенклатура дейтерированных соединений проста. Обычно производное соединение имеет префикс дей- (deu-) и далее следует идентичное название соединения предшественника (например, дейтетрабеназин). Для краткости префикс deu- заменяют на d_i , где i – число атомов дейтерия в молекуле.

История дейтерированных соединений

Самые первые примеры включения дейтерия в биологически активные соединения упоминаются в работах середины XX в. Две независимые группы исследователей сообщили о снижении скорости биотрансформации d_2 -тирамина и d_3 -морфина по сравнению с родительскими протонсодержащими соединениями [16, 17]. Интервал времени между публикацией первых патентов на дейтерированную субстанцию и регистрацией лекарственных препара-

тов на их основе составил около полувека. Таким примером является дейтетрабеназин (d_6 -тетрабеназин), одобренный Food and Drug Administration (FDA) в 2017 (таблица 1). Химически дейтетрабеназин является изотопным изомером тетрабеназина («биоизостером»), в котором шесть атомов протия заменены на атомы дейтерия. Улучшение фармакокинетических характеристик в результате дейтерирования позволило снизить дозу в два раза по сравнению с тетрабеназином. Таким образом, новый препарат характеризуется сниженным числом суточных введений, а его переносимость улучшена по сравнению с родительским соединением [17].

Первая регистрация дейтерированного препарата – знаковое событие для нового направления фармации [5].

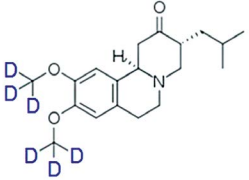
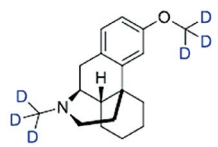
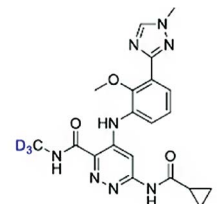
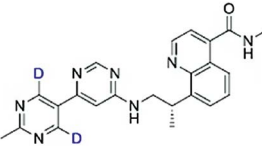
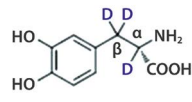
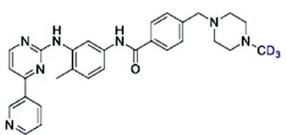
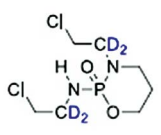
Другой дейтерированный препарат, представляющий собой комбинацию d_6 -декстрометорфана и хинидина (см. таблицу 1), получил поддержку FDA для ускоренного продвижения [20]. Его родоначальник – комбинированный препарат Nuedexta®, состоящий из 20 мг декстрометорфана и 10 мг хинидина, используется для лечения псевдобульбарного аффекта. Хинидин замедляет метаболизм декстрометорфана до O-деметилованного продукта в первой стадии биотрансформации и увеличивает период полувыведения. Оказалось, что для достижения эквивалентного воздействия при использовании дейтерированного декстрометорфана требуется значительно меньше токсичного хинидина. Увеличение $t_{1/2}$ d_6 -декстрометорфана позволило не только снизить дозу активной фармацевтической субстанции, но и обеспечить защиту от побочного действия хинидина.

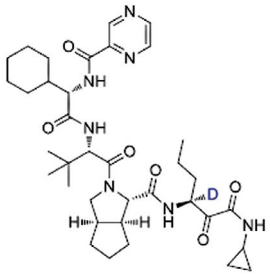
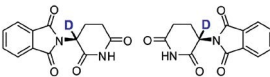
Известны дейтерированные биоактивные соединения, не являющиеся аналогами известных лекарств. Среди субстанций этой группы клинических испытаний достигли два дейтерированных соединения – BMS-986165 и VX-984 (см. таблицу 1). Первое соединение является мощным селективным ингибитором тирозинкиназы [21]. Для второго соединения были получены обнадеживающие результаты плацебо-контролируемых клинических испытаний в лечении псориаза [22] и метастатического рака эндометрия [23].

Как правило, дейтерирование приводит к изменению фармакокинетических характеристик активного ингредиента: увеличению площади под фармакокинетической кривой при парентеральном введении (AUC – area under curve), максимальной концентрации в кровотоке (C_{max}) и периода полувыведения ($t_{1/2}$), в то время как влияние на время достижения C_{max} (T_{max}) незначительно [3, 4]. Примечательно, что дейтерий также может быть использован не только для пролонгирования высвобождения лекарств, но и для биодеградации полимерных материалов капсулированных форм [24].

Таблица 1. Преимущества дейтерированных лекарств

Table 1. Benefits of Deuterated Medicines

Дейтерированный аналог	Фармакокинетические характеристики, механизмы биотрансформации	Применение	Лит источник
 d_6 -тетрабеназин	Увеличение $t_{1/2}^*$ с 4,8 ч до 8,6 ч. Двукратное увеличение AUC*	Разработан для снижения симптомов орфанного заболевания – хореи Гентингтона (Huntington)	[18, 19]
 d_6 -декстрометорфан + хинидин	Увеличение $t_{1/2}^*$, AUC* и C_{max}^* . Ультранизкая доза хинидина по сравнению с противным предшественником	Для лечения псевдобульбарного аффекта; III фаза клинических испытаний – делирий, связанный с болезнью Альцгеймера; II фаза – депрессия и остаточная шизофрения	[20]
 BMS-986165	Ингибитор тирозинкиназы	Новая субстанция, не имеет противного аналога. Доклинические испытания – системная красная волчанка и воспалительные заболевания кишечника	[21]
 VX-984	Ингибитор ДНК-зависимой протеинкиназы	Новая субстанция, не имеет противного аналога. Клинические испытания – лечение псориаза; метастатического рака эндометрия	[22, 23]
 d_3 -леводопа	Изменение скорости реакций, катализируемых моноаминоксидазой (MAO) и дофамин β -гидроксилазой (DBH)	Болезнь Паркинсона	[25]
 d_3 -иматиниб	Снижение N-деметилирования при инкубации с микросомами печени человека	Противолейкозный цитостатический препарат, таргетный цитостатик, избирательно воздействующий на клетки, имеющие те или иные характерные для опухолей генетические дефекты	[5]
 d_4 -ифосфамид	Увеличение терапевтического индекса за счет преобладания гидроксирования над N-дехлорированием	Цитостатический противоопухолевый химиотерапевтический препарат алкилирующего действия	[26]

Дейтерированный аналог	Фармакокинетические характеристики, механизмы биотрансформации	Применение	Лит источник
 d ₁ -теллапревир	Включение дейтерия в хиральный центр приводит к снижению скорости эпимеризации	Относится к классу ингибиторов протеаз HCV	[33]
 S- и R-энантиомеры талидомида	R-энантиомер в 5 раз более стабилен к эпимеризации по сравнению с противным аналогом	Иммуномодуляторы. S(+)-дейтерированный энантиомер является противоопухолевым препаратом, тогда как R(-)-дейтерированный энантиомер практически не оказывает влияния на рост опухоли	[34–36]

Примечание: *AUC (area under curve) – площадь под фармакокинетической кривой при парентеральном введении препарата; C_{max} – максимальная концентрация в кровотоке; t_{1/2} – период полувыведения активного ингредиента из кровотока; T_{max} – время достижения C_{max}.

Note: *AUC (area under curve) – the area under the pharmacokinetic curve with parenteral administration of the drug; C_{max} – maximum concentration in the bloodstream; t_{1/2} – half-life of the active ingredient from the bloodstream; T_{max} – time to reach C_{max}.

Дейтерирование и биотрансформация лекарств

Замещение протия на дейтерий используют для снижения скорости окислительных процессов с участием цитохрома P450 (CYP450). Так дейтерирование родительской молекулы леводопы привело к изменению скорости реакций, катализируемых моноаминоксидазой (MAO) и дофамин β-гидроксилазой (DBH). После декарбоксилирования d₃-леводопы при участии ароматической декарбоксилазы L-аминокислот (AADC) наблюдается дейтерий-зависимая биотрансформация d₃-дофамина (рисунок 1).

Появление дейтерия у β-углеродного атома сопровождается снижением активности DBH и количества d₂-норадреналина. При моделировании болезни Паркинсона у грызунов дейтерированный препарат d₃-ле-

водопа оказался более эффективным по сравнению с противным предшественником [25].

Появление дейтерия у α-углеродного атома снижает активность MAO и количество образующейся d₂-3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты.

Таким образом, введение дейтерия в различные центры исходной молекулы может изменять скорости отдельных путей биотрансформации дейтерированных лекарств и накопления тех или иных биологически активных продуктов.

Снижение токсичности при дейтерировании

Дейтерирование может быть использовано для снижения числа и количества нежелательных метаболитов («метаболическое шунтирование»). Включение дейтерия в α- и α'-положения в ифосфамиде при-

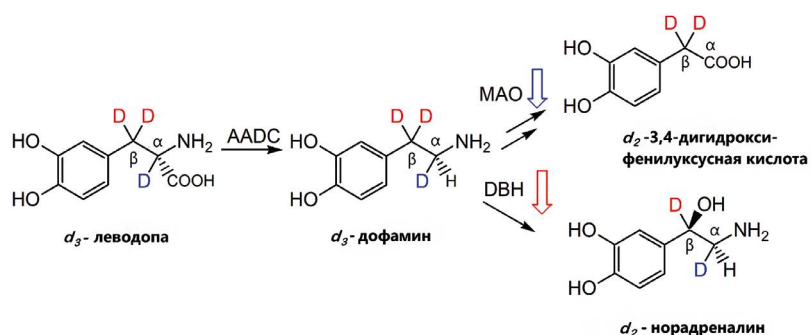


Рисунок 1. Биотрансформация d₃-леводопы [5, 25]
Figure 1. Biotransformation of d₃-levodopa [5, 25]

водит к усилению гидроксилирования в положении 4' (см. таблицу 1) и снижению токсичных продуктов N-дехлорирования по сравнению с недеитерированным препаратом [26]. Метаболическое шунтирование, выражающееся в преобладании гидроксилирования над N-дехлорированием с образованием нефротоксического хлорацетальдегида ($\text{Cl}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{O}$), увеличивает терапевтический индекс препарата.

Деитерирование молекулы эритромицина В также сопровождается снижением побочных эффектов моторики кишечника в результате подавления образования 6,9-енольного эфира [27]. При этом не нарушается антибактериальный эффект лекарства.

Интересен результат исследования трамадола, который быстро метаболизируется до O-деметилированного метаболита [28]. Идентичный продукт биотрансформации d_9 -трамадола проявляет 5–10-кратную активность по отношению к опиоидным рецепторам *in vitro*.

Стабилизация стереоизомеров при деитерировании

Для снижения побочного действия оптически активных фармацевтических субстанций с 1992 года разрабатываются энантиоочищенные препараты. Это позволило регистрировать более эффективный энантиомер как новое ЛС [29–32]. Такой подход, известный как «хиральное переключение», завершился поступлением в продажу чистых энантиомеров.

В то же время для ряда оптически активных субстанций хиральное переключение невозможно из-за быстрого взаимопревращения стереоизомеров *in vitro* и/или *in vivo*. Замена протия на дейтерий в хиральном центре может стабилизировать стереоизомер.

Так, например, *телапревир* (см. таблицу 1), относящийся к классу противовирусных препаратов класса ингибиторов протеаз и применяющийся для лечения гепатита С, подвергается в организме эпимеризации с образованием R-диастереоизомера [33], который примерно в 30 раз менее активен в отношении протеаз HCV по сравнению с оптическим антиподом. Селективное деитерирование телапревира S-конфигурации в хиральный центр рядом с α -кетоамидом приводит к снижению скорости эпимеризации и увеличению терапевтического эффекта.

Тератогенный эффект *талидомида* (см. таблицу 1) относится главным образом к S(+)-энантиомеру [34–36]. Введение только R(-)-энантиомера не предотвращает проявление тератогенности из-за значительной и быстрой эпимеризации в физиологических условиях. Было показано, что деитерирование частично преодолевает этот недостаток [36].

Влияние дейтерия на кинетические эффекты биотрансформации фармацевтических субстанций не ограничены приведенными примерами. Все новые и новые деитерированные соединения характеризуются как перспективные субстанции для возможного применения в качестве лекарств.

ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ D/H В ВОДЕ НА МЕХАНИЗМЫ ПРЕВРАЩЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

Кинетические изотопные эффекты дейтерия обнаружены в водных растворах фармацевтических субстанций с разным соотношением D/H. В связи с использованием в атомной энергетике тяжелой воды D_2O механизмы влияния ее на биологические объекты были исследованы достаточно подробно [1, 7–12, 37, 38]. Но поведение фармацевтических субстанций в воде, обедненной по дейтерию, как и влияние соотношения дейтерий/протий на организмы разного иерархического уровня, до последнего десятилетия, оставались практически не изученными.

Определение понятия «легкая» вода (*deuterium-depleted water, ddw*), обусловлено тем, что в результате ректификации увеличивается доля легкого изотопа воды $^1\text{H}_2^{16}\text{O}$ в сравнении со стандартными образцами. В основе значимых биологических ответов ddw лежат различия физико-химических свойств воды, обедненной по тяжелым изотопам, и воды природного изотопного состава.

Исследование изотопного эффекта на молекулярном уровне

Кинетика мутаротации углеводов и оптическое вращение растворов аминокислот. Обнаружены отличия в кинетике мутаротации углеводов (рисунок 2). Они могут быть связаны с различиями

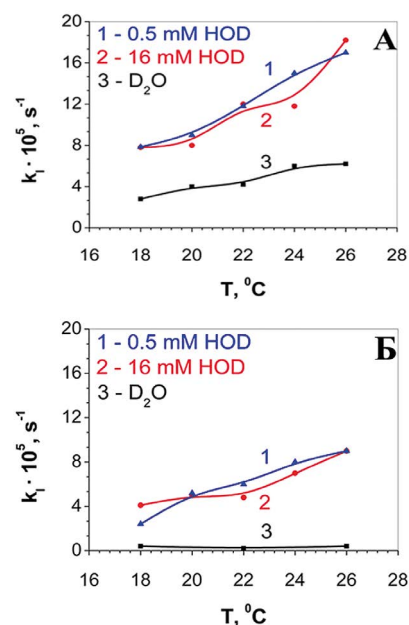


Рисунок 2. Изменение скорости удельного вращения (k_t) галактозы с ростом температуры

А – D-изомер; Б – L-изомер (среднее \pm SD; $n = 6$; $p < 0,05$) [11]

Figure 2. The change in the specific rotation speed (k_t) of galactose with increasing temperature

А – D-isomer, Б – L-isomer (mean \pm SD; $n = 6$; $p < 0.05$) [11]

в длине и энергии О–Н и О–D связей воды, которая участвует в установлении равновесия между аномерами углеводов через ациклическую форму. Это подтверждается значительно меньшей скоростью мутаротации обоих энантиомеров галактозы в тяжелой воде [7]. В природной и легкой воде эти скорости значительно ниже для L-формы оптического изомера. В тяжелой воде мутаротация L-изомера вообще не протекает. Влияние изотопного состава воды подтверждено в ходе изучения температурной зависимости кинетики мутаротации D-глюкозы в аррениусовских координатах. Значения энергии активации процесса мутаротации в природной высокоомной воде $E_a = 40,8 \pm 1,4$ кДж/моль, тогда как в ddw $E_a = 63,6 \pm 3,5$ кДж/моль, т. е. кинетический изотопный эффект, оцененный через энергии активации, больше единицы и составляет 1,6 [8]. Это также свидетельствует об изотопной зависимости процесса.

Для оптических изомеров валина обнаружены статистически значимые различия удельного вращения в водах разного изотопного состава. Прослеживается четкая зависимость оптической активности валина от содержания дейтерия в воде в интервале pH = 2–10. Обнаружен некомпенсированный положительный или отрицательный заряд в растворе двух оптических антиподов. Это объясняется формированием хиральности в гигантских гетерогенных кластерах воды (ГГКВ) под воздействием оптически активной субстанции [39, 40].

Скорость растворения фармацевтических субстанций. Кинетика растворения большого числа фармацевтических субстанций, контролируемая методом лазерного затемнения (laser obscuriaion) продемонстрировала возрастание КИЭ при снижении соотношения D/H в воде. Так, например, при снижении концентрации HOD от 16 до 0,5 ммоль/л скорость растворения субстанций возрастала для топирамата в 1,1 раза, лактозы в 1,3 раза, бендазола гидрохлорида в 1,6 раза.

Организменный уровень

Клеточные культуры. Константа скорости процесса необратимого клеточного перехода *S. ambigua* от активного до иммобилизованного состояния снижается более чем на порядок при истощении дейтерия от 16 mM до 0,5 mM. Кривая времени жизни клеточного биосенсора проходит практически параллельно оси абсцисс в интервале значений D/H от 90 ppm до 150 ppm и постепенно снижается за пределами этого интервала (рисунок 3). Зависимость «доза – ответ» для соотношения D/H идентична классическим кривым для эссенциальных микроэлементов: их недостаток или избыток приводит к гибели животного. В то же время существует зона безопасности, обеспечивающая нормальную выживаемость организма [2, 7, 42].

Детально исследована выживаемость одноклеточного организма – инфузории *S. ambigua* в водных растворах АФИ и ВВ с разным соотношением

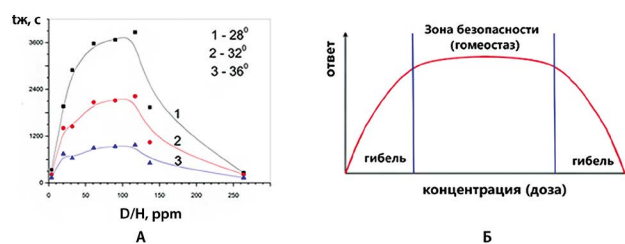


Рисунок 3. Зависимость продолжительности жизни *S. ambigua* от концентрации дейтерия в воде при 28 (1), 32 (2) и 36 °C (3).

А – среднее \pm SD; n = 18; p < 0,01 [7]; Б – диаграмма «доза – ответ» для эссенциальных элементов [2, 42]

Figure 3. Life span of *S. ambigua* versus deuterium concentration in water at 28 (1), 32 (2) and 36 °C (3).

А – mean \pm SD; n = 18; p < 0.01 [7]; Б – chart «dose – response» for essential elements [2, 42]

D/H [7, 8]. В водах разного изотопного состава были получены статистически достоверные различия значений кажущейся энергии активации $^{obs}E_a$ лиганд-индуцированной клеточной гибели в растворах ряда субстанций (рисунок 4).

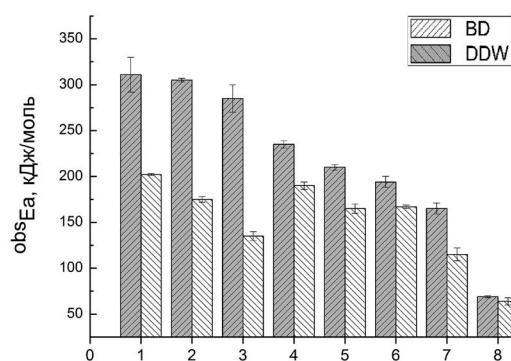


Рисунок 4. Ранжирование ксенобиотиков по значениям $^{obs}E_a$ в воде с пониженным содержанием дейтерия – ddw (D/H = 4 ppm) и высокоомной воде природного изотопного состава – BD (D/H = 140 ppm):

$t_{ж} = 300$ сек; T = 28 °C. 1 – Na_2SO_3 ; 2 – 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридина сукцинат (мексидол); 3 – аскорбиновая кислота; 4 – Na_2H_2Edta ; 5 – 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридина гидрохлорид (эмоксипин); 6 – $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 7 – $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 8 – NaCl [8]

Figure 4. The ranking of xenobiotics by $^{obs}E_a$ values in water with a low deuterium content – ddw (D/H = 4 ppm) and high-resistance water of natural isotopic composition – BD (D/H = 140 ppm):

$t_{ж} = 300$ sec; T = 28 °C. 1 – Na_2SO_3 ; 2 – 3-hydroxy-6-methyl-2-ethylpyridine succinate (mexidol); 3 – ascorbic acid; 4 – Na_2H_2Edta ; 5 – 3-hydroxy-6-methyl-2-ethylpyridine hydrochloride (emoxypine); 6 – $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 7 – $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 8 – NaCl [8]

Оказалось, что вода с пониженным содержанием дейтерия проявляла антидотные свойства: снижение содержания тяжелого изотопа водорода приводило к увеличению выживаемости инфузорий в среднем в полтора раза. Как и в предыдущих примерах, КИЭ, рассчитанный для многочисленных субстанций че-

рез энергии активации клеточной гибели, превышал единицу.

Было показано изменение скорости пролиферации жировых стромальных клеток (ADSCs) человека *in vitro* в зависимости от концентрации дейтерия в культуральной среде [43]. Наблюдалась морфологическая изменения в дейтерированной среде: клетки не достигали конfluence, имели полигональную морфологию с ярко выраженными стресс-фибриллами. При высоких содержаниях дейтерия в питательной среде отмечено увеличение времени удвоения популяции, что указывает на замедление клеточного цикла и, как следствие, пролиферативной способности культуры клеток. В дейтерированной и обедненной по дейтерию культуральных питательных средах отмечена острая и хроническая токсичность. Наименьшая интенсивность миграции наблюдалась в дейтерированной питательной среде, а наиболее активная миграционная способность отмечена в обедненной по дейтерию среде с близким к природному отношению D/H. В дейтерированной питательной среде наблюдается снижение метаболической активности на третьи сутки, а в обедненной по дейтерию среде отмечено повышение жизнеспособности культуры ADSCs [43].

Растительные объекты. Для каллизии душистой (*Callisia fragrans* L.) обнаружено, что в воде, обедненной по дейтерию, перераспределение и усвоение минеральных компонентов происходит быстрее – в два и более раза по сравнению с водой природного изотопного состава. Это позволило использовать каллизию как модельный объект насыщения микроэлементами, в частности, цинком [12].

Как известно, мох *Physcomitrella Patens* является важным фундаментальным объектом протеомики. При исследовании мха этого вида была обнаружена значительная разница в изменении пептидного состава в водах с различным соотношением D/H. Это связано с изменением метаболизма организма в целом [44].

Человек. Содержание дейтерия в организме «условного» человека (массой 70 кг) составляет около 1 г, что при ранжировании необходимых микроэлементов соответствует его позиции между медью (100 мг) и цинком (2 г) и на 2–3 порядка выше по сравнению с Co, Mn, Mo [2, 42]. Это позволяет прогнозировать его участие в биохимических процессах в организме. Дефицит и избыток этого изотопа водорода может нарушать гомеостаз и смещать равновесия обратимых процессов в организме [37, 39, 40]. Экспериментальные результаты, полученные *in vitro* и *in vivo* в Венгрии, Японии, США, Китае, Румынии, России, позволяют предполагать возможность использования воды, обедненной по дейтерию, в качестве адъювантного средства в лечении рака. Особенно значимы исследования Г. Шомлая (Gabor Somlay) в Венгрии, начатые еще во второй половине XX в. [1, 7, 8]. Замена обычной воды (D/H = 130–150 ppm) на «легкую» (D/H = 20–120 ppm) сопровождается уменьшением размера опухоли, по-

степенным некрозом опухолевых клеток, увеличением средней выживаемости больных (рак простаты, рак молочной железы, рак легких и др.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На волне успешной регистрации дейтетрабеназина ряд других дейтерированных соединений активно участвуют в клинических испытаниях [5, 6]. В то время, как использование дейтерия в разработке лекарств неуклонно растет, число проблематичных моментов по использованию этой биоизостерической замены не снижается. Среди них ошибочное мнение о возможной токсичности дейтерия, неопределенности в отношении затрат для производства дейтерированных ЛП, невыясненные механизмы увеличения КИЭ для отдельных субстанций, длительность в одобрении дейтерированных ЛП регуляторными органами. Одобрение FDA дейтетрабеназина увеличивает вероятность того, что дейтерирование получит зеленый свет для доклинических и клинических исследований субстанций.

С учетом многочисленных сведений о КИЭ фармацевтических субстанций в водах с разным соотношением D/H можно прогнозировать, что дейтерий становится медико-химическим инструментом. Несомненно, в недалеком будущем прояснятся механизмы влияния дейтерия в воде на биохимические превращения фармацевтических субстанций в организме. Одним из возможных вариантов такой расшифровки может стать пример мутаротации углеводов, протекающей через ациклическую форму с участием молекул воды смешанного изотопного состава (H–O–D).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Syroeshkin A., Levitskaya O., Uspenskaya E., Pleteneva T. Deuterium Depleted Water as an Adjuvant in Treatment of Cancer. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2019; 10(1): 112–117. DOI: 10.5530/srp.2019.1.19.
2. Zoroddu M. A., Aaseth J., Crisponi G., Medici S., Peana M., Nurchi V. M. The essential metals for humans: A brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2019. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013.
3. Atzrodt J., Derdau V., William J., Reid M. Deuterium- and tritium-labelled compounds: applications in the life sciences. *Angew Chem Int Ed*. 2018; 57: 1758–1784.
4. Masson G. R., Jenkins M. L., Burke J. E. An overview of hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2017; 12(10): 981–994. DOI: 10.1080/17460441.2017.1363734.
5. Pirali T., Serafini M., Cargini S., Genazzani A. A. Applications of Deuterium in Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2019; 62(11): 5276–5297. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01808.
6. Roger D. Tung. Deuterium medicinal chemistry comes of age. *Future Med. Chem*. 2016; 8(5): 491–494.
7. Syroeshkin A. V., Pleteneva T. V., Uspenskaya E. V., Zlatkiy I. A., Antipova N. A., Grebennikova T. V., Levitskaya O. V. D/H control of chemical kinetics in water solutions under low deuterium concentrations. *Chemical Engineering Journal*. 2019; 377: 119827. DOI: 10.1016/j.cej.2018.08.213.
8. Levitskaya O. V., Syroeshkin A. V., Pleteneva T. V. Arrhenius kinetics as a bioactivity assessment criterion for drug substances and excipients. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016; 49(11): 779–781.

9. Somlyai G., Javaheri B., Davari H., Gyöngyi Z., Somlyai I., Tamaddon K. A., Boros L. G. Pre-clinical and clinical data confirm the anticancer effect of deuterium depletion. *Biomacromol J.* 2016; 2(1): 1–7.
10. Krempels K., Somlyai I., Gyöngyi Z., Ember I., Balog K., Abonyi O., Somlyai G. A. Retrospective study of survival in breast cancer patients undergoing deuterium depletion in addition to conventional therapies. *J Cancer Res Ther.* 2013; 1(8): 194–200.
11. Zrellov O. Yu., Syroeshkin A. V., Uspenskaya E. V., Titorovich (Levitskaya) O. V. Effect of water isotopic composition on galactose mutarotation kinetics. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2015; 49(6): 413–416.
12. Makarova M. P., Syroeshkin A. V., Maksimova T. V., Matveeva I. S., Pleteneva T. V. Features of the rapid determination of trace elements in medicinal and unofficial plants. *Development and registration of medicines.* 2019; 8(2): 93–97 (in Russ.).
13. Mullard A. Deuterated drugs draw heavier backing. *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2016; 15: 219–221.
14. Thulasiram H. V., Phan R. M., Rivera S. B., Poulter C. D. Synthesis of deuterium-labeled derivatives of dimethylallyl diphosphate. *J. Org. Chem.* 2006; 71: 1739–1741.
15. Sattler A. Hydrogen/Deuterium (H/D) exchange catalysis in alkanes. *ACS Catal.* 2018; 8: 2296–2312.
16. Belleau B., Burba J., Pindell M., Reiffenstein J. Effect of deuterium substitution in sympathomimetic amines on adrenergic responses. *Science.* 1961; 133: 102–104.
17. Elison C., Rapoport H., Laursen R., Elliott H. W. Effect of deuteration of N-CH₃ group on potency and enzymatic N-demethylation of morphine. *Science.* 1961; 134: 1078–1079.
18. DeWitt S. H., Maryanoff B. E. Deuterated Drug Molecules: Focus on FDA-Approved Deutetrabenazine. *Biochemistry.* 2018; 57: 472–473.
19. Claassen D. O., Carroll B., De Boer L. M., Wu E., Ayyagari R., Gandhi S., Stamler D. Indirect tolerability comparison of deutetrabenazine and tetrabenazine for Huntington disease. *J. Clin. Mov. Disord.* 2017; 4: 3–13.
20. Garay R. P., Grossberg G. T. AVP-786 for the treatment of agitation in dementia of the Alzheimer's type. *Expert Opin. Invest. Drugs.* 2017; 26: 121–132.
21. Xie J. H., Gillooly K., Zhang Y., Yang X., Zupa-Fernandez A., Cheng L., Strnad J., Heimrich E., Zhou X., Chen J., Chaudhry C., Li S., Moslin R., Wroblewski S., Weinstein D., Burke J. 349 – BMS-986165 is a highly potent and selective allosteric inhibitor of TYK2, blocks IL-12, IL-23 and type I interferon signaling and provides for robust efficacy in preclinical models of systemic lupus erythematosus and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2018; 154: S-1357.
22. Khan A. J., Misenko S. M., Thandoni A., Schiff D., Jhawar S. R., Bunting S. F., Haffty B. G. VX-984 is a selective inhibitor of non-homologous end joining, with possible preferential activity in transformed cells. *Oncotarget.* 2018; 9: 25833–25841.
23. First-in-Human Study of the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Profile of VX-984 in Combination with Chemotherapy. ClinicalTrials.gov identifier: NCT02644278. Last update: June 5, 2018. Accessed on November 15, 2018.
24. Hearn B. R., Fontaine S. D., Pfaff S. J., Schneider E. L., Henise J., Ashley G. W., Santi D. V. Primary deuterium kinetic isotope effects prolong drug release and polymer biodegradation in a drug delivery system. *J. Controlled Release.* 2018; 278: 74–79.
25. Malmöf T., Rylander D., Alken R. G., Schneider F., Svensson T. H., Cenci M. A., Schilström B. Deuterium substitutions in the L-DOPA molecule improve its anti-kinetic potency without increasing dyskinesias. *Exp. Neurol.* 2010; 225: 408–415.
26. Calinski D. M., Zhang H., Ludeman S., Dolan M. E., Hollenberg P. F. Hydroxylation and N-dechloroethylation of ifosfamide and deuterated ifosfamide by the human cytochrome p450s and their commonly occurring polymorphisms. *Drug Metab. Dispos.* 2015; 43: 1084–1090.
27. Bhadra P. B., Hassanzadeh A., Arsic B., Allison D. G., Morris G. A., Barber J. Enhancement of the properties of a drug by monodeuteration: reduction of acid-catalysed formation of a gut-motilide enol ether from 8-deuterio-erythromycin B. *Org. Biomol. Chem.* 2016; 14: 6289–6296.
28. Shao L., Abolin C., Hewitt M. C., Koch P., Varney M. Derivatives of tramadol for increased duration of effect. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006; 16: 691–694.
29. Smith S. W. Chiral toxicology: It's the same thing...only different. *Toxicol. Sci.* 2009; 110: 4–30.
30. Csuk R. Biocatalysis in the Pharma and Biotech Industries. *CRC Press: Boca Raton, FL.* 2007; 699–716.
31. Hutt A. J., Valentova J. The chiral switch: The development of single enantiomer drugs from racemates. *Acta Fac. Pharm. Univ. Comeniana.* 2003; 50: 7–23.
32. Ali I. Homochiral drug design and development by racemization. *Comb. Chem. High Throughput Screening.* 2007; 10: 326–335.
33. Maltais F., Jung Y. C., Chen M., Tanoury J., Perni R. B., Mani N., Laitinen L., Huang H., Liao S., Gao H., Tsao H., Block E., Ma C., Shawgo R. S., Town C., Brummel C. L., Howe D., Pazhanisamy S., Raybuck S., Namchuk M., Bennani Y. L. *In vitro* and *in vivo* isotope effects with hepatitis C protease inhibitors: enhanced plasma exposure of deuterated telaprevir versus telaprevir in rats. *J. Med. Chem.* 2009; 52: 7993–8001.
34. Mori T., Ito T., Liu S., Ando H., Sakamoto S., Yamaguchi Y., Tokunaga E., Shibata N., Handa H., Hakoshima T. Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon. *Sci. Rep.* 2018; 8: 1294–1307.
35. Yamamoto T., Tokunaga E., Nakamura S., Shibata N., Toru T. Synthesis and configurational stability of (S)- and (R)-deuteriothalidomides. *Chem. Pharm. Bull.* 2010; 58: 110–112.
36. Jacques V., Czarnik A. W., Judge T. M., Van der Ploeg L. H., DeWitt S. H. Differentiation of antiinflammatory and antitumorigenic properties of stabilized enantiomers of thalidomide analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015; 112: E1471–E1479.
37. Basov A., Fedulova L., Baryshev M., Dzhimak S. Deuterium-depleted water influence on the isotope ²H/¹H regulation in body and individual adaptation. *Nutrients.* 2019; 11: 1903. DOI: 10.3390/nu11081903.
38. Zlatitskiy I. A., Zlatska A. V., Antipova N. V., Syroeshkin A. V. Effect of deuterium on the morpho-functional characteristics of normal and cancer cells in vitro. *Trace Elements and Electrolytes.* 2018; 35: 211–214. DOI: 10.5414/TEX0155410.
39. Goncharuk V. V., Syroeshkin A. V., Pleteneva T. V., Uspenskaya E. V., Levitskaya O. V., Tverdislov V. A. On the possibility of chiral structure-density submillimeter inhomogeneities existing in water. *Journal of Water Chemistry and Technology.* 2017; 39(6): 319–324. DOI: 10.3103/s1063455x17060029.
40. Goncharuk V. V., Pleteneva T. V., Grebennikova T. V., Syroeshkin A. V., Uspenskaya E. V., Antipova N. V., Zlatitskiy I. A. Determination of Biological Activity of Water Having a Different Isotope Ratio of Protium and Deuterium. *Journal of Water Chemistry and Technology.* 2018; 40(1): 27–34. DOI: 10.3103/s1063455x18010058.
41. Uspenskaya E. V., Anfimova E. V., Syroeshkin A. V., Pleteneva T. V. Kinetics of pharmaceutical substance solubility in water with different hydrogen isotopes content. *Indian J Pharm Sci.* 2018; 80: 318–24.
42. Maret W. The Metals in the biological periodic system of the elements: concepts and conjectures. *International Journal of Molecular Sciences.* 2016; 17(1): 66. DOI: 10.3390/ijms17010066.
43. Halenova T., Zlatitskiy I., Syroeshkin A., Maximova T., Pleteneva T. Deuterium-Depleted Water as Adjuvant Therapeutic Agent for Treatment of Diet-Induced Obesity in Rats. *Molecules.* 2020; 25(1): 23. DOI: 10.3390/molecules25010023.
44. Makarova M., Syroeshkin A., Maksimova T., Pleteneva T., Zlatitskiy I., Antipova N., Skripnikov A., Dzhevakhyan M. D/H modification of plant peptides and microelements metabolome. *FEBS Open Bio.* 2019; 9: 287–288. DOI: 10.1002/2211-5463.12675.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-33-44>
УДК



Обзорная статья/Review article

Перспектива создания лекарственных препаратов на основе наночастиц селена (обзор)

К. Д. Скоринова¹, В. В. Кузьменко¹, И. А. Василенко¹

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

*Контактное лицо: Скоринова Кристина Довлетовна. E-mail: kristina.skorinova@gmail.com

Статья получена: 16.03.2020. Статья принята к печати: 15.05.2020

Резюме

Введение. В настоящее время в литературе широко обсуждаются перспективы использования наночастиц при создании лекарственных препаратов. Количество регистрационных удостоверений, выданных национальными регуляторами только за 2018 год на лекарственные препараты, в которых наночастицы используются в том или ином виде, составляет около сорока. Большинство из них составляют лекарственные препараты на основе липосом, полимеров, оксидов железа, мицелл. До сих пор не выдано ни одного регистрационного удостоверения на наночастицы селена. Одна из причин такого положения в данной области, с нашей точки зрения, заключается в том, что механизмы взаимодействия наночастиц с клетками изучены недостаточно. Отсутствие фундаментальных исследований в данной области является одним из основных препятствий при разработке лекарственных препаратов нового поколения на основе наночастиц.

Текст. Данный обзор посвящен анализу научной литературы по исследованию взаимодействия наночастиц селена с разными видами клеток. В статье рассматриваются биологические свойства селена и его роль в метаболизме клеток. Приводятся данные о цитотоксическом действии наночастиц селена на различные клеточные культуры. Описаны методы получения наночастиц и методы исследования взаимодействия наночастиц с клеточными культурами.

Заключение. Анализ литературных данных позволяет сделать выводы об актуальности исследований взаимодействия наночастиц селена с живыми клетками. Это необходимо для определения механизмов поглощения наночастиц селена, изучения их цитотоксического и/или цитостатического действия, распределения в клетках. Исследования биологического взаимодействия наночастиц селена с опухолевыми и нормальными клетками позволит определить наиболее информативные методы регистрации и количественной оценки их противоопухолевой активности, что актуально при разработке новых лекарственных средств против рака.

Ключевые слова: селен, наночастицы селена, взаимодействие наночастиц с клетками, методы исследования наночастиц с клетками, получение наночастиц селена, биологические свойства наночастиц селена, цитостатическое действие наночастиц селена.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Автор К. Д. Скоринова провела обзор публикаций по теме статьи. Все авторы участвовали в написании и редактировании текста статьи.

Для цитирования: Скоринова К. Д., Кузьменко В. В., Василенко И. А. Перспектива создания лекарственных препаратов на основе наночастиц селена. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 33–44.

The Prospect of Creating Medicines Based on Selenium Nanoparticles (Review)

Kristina D. Skorinova¹, Valeriya V. Kuzmenko¹, Ivan A. Vasilenko¹

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

*Corresponding author: Kristina D. Skorinova. E-mail: kristina.skorinova@gmail.com

Received: 16.03.2020. Accepted: 15.05.2020

Abstract

Introduction. The prospects of using nanoparticles in the production of medicines are widely discussed in the literature. In 2018 alone, the quantity of registration certificates issued by national regulators for medicines that use nanoparticles in one form or another is around forty. Most of them are medicines based on liposomes, polymers, iron oxides, micelles. So far, no registration certificates have been issued for selenium nanoparticles. One of the reasons for this situation in this area, from our point of view, is that the mechanisms of interaction of nanoparticles with cells are not sufficiently studied. The lack of basic research in this area is one of the main obstacles to the development of new-generation drugs based on nanoparticles.

Text. This review is devoted to the analysis of scientific data on the interaction of selenium nanoparticles with different types of cells. The article discusses the biological properties of selenium and its role in cell metabolism. Data on the cytotoxic effect of selenium nanoparticles on various cell cultures are presented. Methods of preparation of nanoparticles and methods for studying the interaction of nanoparticles with cell cultures are described.

Conclusion. Analysis of the literature data allows us to draw conclusions about the relevance of research on the interaction of selenium nanoparticles with living cells. This is necessary to determine the mechanisms of selenium nanoparticles absorption, study their cytotoxic and / or cytostatic action, and distribution in cells. Investigation of the biological interaction of selenium nanoparticles with tumor and normal cells will determine the most informative methods for registering and quantifying their antitumor activity, which is relevant for the development of new drugs to treat cancer.

Keywords: selenium, selenium nanoparticles, interaction of nanoparticles with cells, research methods for nanoparticles with cells, synthesis of selenium nanoparticles, biological properties of selenium nanoparticles, cytostatic effect of selenium nanoparticles.

Conflict of interest: no conflict of interest.

© Скоринова К. Д., Кузьменко В. В., Василенко И. А., 2020

© Skorinova K. D., Kuzmenko V. V., Vasilenko I. A., 2020

Contribution of the authors. Author Kristina D. Skorinova reviewed publications on the topic of the article. All authors participated in writing and editing the text of the article.

For citation: Skorinova K. D., Kuzmenko V. V., Vasilenko I. A. The prospect of creating medicines based on selenium nanoparticles. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 33–44.

ВВЕДЕНИЕ

В литературе широко обсуждаются перспективы использования наночастиц при создании лекарственных препаратов. Количество регистрационных удостоверений, выданных национальными регуляторами на лекарственные препараты, в которых наночастицы (НЧ) используются в том или ином виде, крайне мало. По данным только за 2018 год порядка сорока препаратов были одобрены и разрешены для использования в клинической практике [1]. Большинство из них составляют лекарственные препараты на основе липосом, полимеров, оксидов железа, мицелл. До сих пор не выдано ни одного регистрационного удостоверения на НЧ селена. Одна из причин такого положения в данной области, с нашей точки зрения, заключается в том, что механизмы взаимодействия НЧ с клетками изучены недостаточно. Отсутствие фундаментальных исследований в данной области является одним из основных препятствий для создания лекарственных препаратов на основе НЧ. В этом обзоре представлены данные научных исследований по свойствам НЧ селена и механизмам взаимодействия этих НЧ с разными видами клеток. Также описаны основные методы получения НЧ селена и методы исследования взаимодействия НЧ с клетками.

В настоящее время изучены НЧ металлов Ag, Au, Cu, Pt, Fe, Se, Si и Zn [2–8]. Особое место занимают НЧ Se. Селен является важным микроэлементом. Он включен в селенопротеины в виде селеноцистеина, представляющего наиболее важную часть активного центра их ферментативной активности. Многие селенопротеины обладают оксидоредуктазной активностью и, таким образом, регулируют физиологический окислительно-восстановительный баланс. Селен имеет узкую границу между терапевтической дозой и токсичностью, тогда как НЧ селена обладают заметно сниженной токсичностью.

В работе Khurana с соавторами [9] было изучено влияние НЧ селена на ряд заболеваний, таких как артрит, рак, диабет и нефропатия с потенциальными терапевтическими преимуществами. Изучение терапевтического действия НЧ селена, по-видимому, обусловлено их специфическими свойствами. Они имеют высокую химическую активность за счет большой удельной площади поверхности, в тоже время НЧ могут преодолевать ограничения обычных систем высвобождения лекарственных средств и имеют высокую проницаемость в клетки. Эти свойства НЧ исполь-

зуются для поиска новых потенциально возможных лекарственных препаратов на их основе, а также систем направленной доставки биологически активных веществ как для диагностики, так и для терапевтического применения.

Цель статьи – изучение и сравнение данных, полученных в результате исследований биологических свойств селена и его роли в метаболизме клеток, в частности, цитотоксического действия наночастиц селена. Рассмотрены методы получения наночастиц селена и методы исследования взаимодействия наночастиц с клетками.

Биологические свойства селена и его роль в метаболизме клеток

Селен является важным микроэлементом человеческого организма, он действует как кофактор в некоторых ферментных структурах, называемых *селенопротеинами* [10]. На сегодняшний день в клетках и тканях человека обнаружено около 25 видов различных селенопротеинов. Селен включен в селеноцистеин в различных антиоксидантных ферментах, таких как глутатионпероксидаза, тиоредоксинредуктаза, селенофосфатсинтетаза и селенопротеин Р. Селен действует как окислительно-восстановительный центр всех этих ферментов и имеет важное значение для их биохимической активности [11].

В антиоксидантной системе защиты организма наиболее чувствительным ферментом к дефициту селена является *глутатионпероксидаза*. При дефиците селена (менее 0,02 мг/кг) биосинтез этого фермента не происходит и, как правило, отсутствует его активная форма, антигенный полипептид и его мРНК. Увеличение содержания селена в организме способствует синтезу селеноферментов до оптимального уровня (по разным данным, примерно 0,2 мг/кг для глутатионпероксидазы и 0,1 мг/кг для селенопротеинов Р и W) [12].

Селенопротеины принимают участие в регуляции и метаболизме тиреоидных гормонов (тироксина) и йодтиронин дейодиназ трех типов. Йодтиронин дейодиназа играет важную роль в активации и инактивации гормонов щитовидной железы. В условиях дефицита селена именно дейодиназы приоритетно обеспечиваются селеном [13]. Аналогично, селен влияет на секрецию инсулина и функцию островков, которые доминируют в гомеостазе глюкозы в крови. Предполагается, что диабетогенное действие, наблюдаемое у здоровых людей с высоким потреблением

селена, частично опосредовано селенопротеинами. Однако селенопротеины могут положительно регулировать метаболизм глюкозы в организме посредством редокс-чувствительной передачи сигналов. Преимущества и риски селена для сахарного диабета являются диалектическими. Высокое потребление селена у здорового человека имеет тенденцию вызывать дисфункцию секреции инсулина, тогда как для диабетического пациента высокое потребление селена полезно для поддержания гомеостаза глюкозы в крови благодаря функции, имитирующей инсулин [14].

Существует ряд заболеваний, связанных с дефицитом селена. Например, форма детской эндемической миокардиомиопатии, болезнь Кешана. Заболевание суставов и костей с множественной деформацией, болезнь Кашина-Бека также может быть связана с дефицитом селена. Болезнь Кешана, как известно, не является результатом окислительного стресса: болезнь Кашина-Бека, вероятно, имеет многофакторную этиологию, дефицит селена может быть ускоряющей причиной или фактором [15].

Для профилактики дефицита селена в организме людей был разработан препарат Селен-Актив®, зарегистрированный как биологически активная добавка (БАД) к пище. Этот препарат рекомендуется применять для нормализации обмена холестерина, для улучшения функционального состояния сердечно-сосудистой системы и повышения функциональной активности антиоксидантной системы организма [16].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) норма потребления селена составляет: для взрослых женщин – 55 мкг/сутки, для взрослых мужчин – 70 мкг/сутки [17]. По разным источникам верхний допустимый уровень потребления селена может составлять от 300 до 600 мкг/сутки [18, 19]. Токсичной дозой считается 900 мкг/сутки. Таким образом, граница между терапевтической и токсической дозой является очень узкой.

Общетоксические свойства наночастиц селена

Исследования отечественных и зарубежных учёных по изучению острой токсичности препаратов на основе селена указывают на более низкую токсичность наночастиц селена по сравнению с селенитом натрия. В исследовании Е. А. Карпов с соавторами [20] изучали токсичность композитного препарата (арабиногалактан + наноселен) на мышах. В дозе 9,12 мг Se/кг препарат НЧ селена не вызвал смерть ни одной мыши; в дозе 20 мг Se/кг – все мыши опытной группы остались живы; доза 40 мг Se/кг также не явилась летальной для животных. Препаратом сравнения являлся селенит натрия, который вызвал 100%-ую гибель мышей в дозе 9,50 мг Se/кг.

В другом исследовании [21] при внутривенном введении препарата с НЧ селена мышам, LD_{50} составляет $32,9 \pm 0,3$ мг/кг. Соответствующий показатель для селенита натрия составил 10 мг/кг.

Исследование острой токсичности на мышах для НЧ селена стабилизированных различными полимерами подтвердило меньшую токсичность наночастиц селена по сравнению с селенитом натрия. Полученные данные по определению LD_{50} (мг Se/кг) и LD_{100} (мг Se/кг) показали, что для поливинилпирролидона $LD_{50} = 32,9$ и $LD_{100} = 56,4$; для желатина $LD_{50} = 23,4$ и $LD_{100} = 48,71$; для хитозана $LD_{50} = 29,7$ и $LD_{100} = 53,2$. Токсичность препарата сравнения – селенита натрия составила $LD_{50} = 8,11$; $LD_{100} = 10,16$ [22].

Исследователи из Китая [3] определяли острую токсичность НЧ селена, который был получен реакцией селенита натрия с глутатионом, содержащим бычий сывороточный альбумин (БСА). Исследования показали, что LD_{50} для НЧ селена (БСА) составила 113,0 мг Se/кг, а LD_{50} для селенита натрия – 15,7 мг Se/кг. Летальная доза органического селена в форме метилселеноцистеина – 27,5 мг Se/кг (вызывает 100%-ую гибель мышей при пероральном введении). Однако НЧ селена (БСА) в дозе 36 мг Se/кг вызывает гибель только 10 % мышей и 70 % мышей в дозе 150 мг Se/кг. Таким образом, острая токсичность НЧ селена в несколько раз ниже селенита натрия.

Биологические свойства наночастиц селена

Исследования биологических свойств НЧ селена, проведенных разными авторами [4, 24–26], подтверждают, что НЧ селена по сравнению с различными формами селена (селенит, селенометионин) обладают заметно сниженной острой и субхронической токсичностью. Все эти соединения селена обладают эквивалентной эффективностью в отношении их способности увеличивать активность селеноферментов [4, 25]. Кроме того, НЧ селена более эффективны, чем селенит натрия и селенометионин, в повышении активности глутатион-S-трансферазы [25, 26] и одинаково эффективны в индукции апоптоза некоторых типов раковых клеток [27]. В дополнение к профилактике рака, НЧ селена также показывают антимикробные свойства [28].

НЧ селена были исследованы при различных окислительных стрессах и заболеваниях, включая рак, диабет, воспалительные заболевания, фиброз печени и токсичность, вызванную лекарственными средствами [29–32]. НЧ селена поглощают свободные радикалы *in vitro* в зависимости от размера (5–200 нм). Во Huang и соавторы провели исследование и выявили, что НЧ селена с размерами 5–15 нм обладают лучшей способностью поглощать свободные радикалы и предотвращают окисление ДНК. НЧ селена показали превосходные эффекты при концентрации менее 0,5 мМ по сравнению с селенитом натрия, IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) которого составляет более 1,5 мМ [33]. В другом исследовании НЧ селена были конъюгированы с синтезированным циклическим пептидом, которые показали улучшенную проницаемость в клеточной линии аденокарциномы яичника SK-OV-3 [34].

Фармакокинетика наночастиц селена

В настоящее время в научной литературе имеются единичные публикации о фармакокинетике НЧ селена. Поглощение, распределение, метаболизм и выведение селена было исследовано группой исследователей из Национального института питания технического университета Дании [35]. Они определяли концентрацию селена в печени, почках, моче, кале, желудке, легких и плазме крови после введения низких и высоких доз НЧ селена размером от 10 до 80 нм и селенита натрия крысам. Результаты показали, что элементный селен присутствовал в печени, почках и кале животных, подвергшихся воздействию низких и высоких доз НЧ селена и селенита натрия. Оба препарата селена были биодоступными, что продемонстрировано с использованием биомаркера крови селенопротеина Р, который был одинаково активен у животных при использовании больших доз. Наконец, выделение селена с мочой и его появление в виде Se-метилселено-N-ацетилгалактозамина и триметилселеноний-иона показали, что НЧ селена и селенит натрия метаболизируются и выводятся из организма. Результаты исследования показали, что оба препарата селена были в равной степени поглощены, распределены, метаболизированы и выведены из организма крыс. Более детальный механизм воздействия НЧ селена и селенита натрия на желудочно-кишечный тракт крыс ещё не изучен [35].

Цитостатическое действие наночастиц селена

Существует проблема использования соединений селена (например, селенита натрия, селеноцистеина, селенометионина) в терапевтическом лечении рака из-за его токсичности и биодоступности. В результате были проведены исследования немодифицированных и модифицированных НЧ селена, которые демонстрируют противоопухолевую активность против нескольких линий раковых клеток в зависимости от времени и дозы [5, 36–39]. НЧ селена способны значительно снизить токсичность элементного селена при использовании их для химиотерапии.

Противораковые свойства НЧ селена широко исследованы как *in vitro*, так и *in vivo* [5–8, 40]. НЧ селена показали ингибирование роста раковых клеток LNCaP простаты *in vitro* частично через апоптоз, опосредованный каспазой [27]. Кроме того, НЧ селена подавляют транскрипционную активность рецептора андрогена посредством подавления экспрессии его мРНК и белка. Результаты *in vitro* дополнительно подтверждаются исследованиями *in vivo*, в которых было обнаружено, что НЧ селена, вводимые перорально мышам BALB/c с опухолями рака молочной железы 4T1, уменьшают объем опухоли и, следовательно, приводят к лучшему прогнозу (более высокому коэффициенту выживаемости) мышей [41].

Изучая потенциал НЧ селена, все больше внимания уделяется модифицированным НЧ селена, в которых конъюгация НЧ селена с функциональными лигандами усиливает их стабилизацию, клеточное поглощение и биоактивность. Было показано, что положительно заряженные НЧ селена усиливают противораковую эффективность, избирательное клеточное поглощение раковыми клетками. Это было продемонстрировано Yu и другими авторами [5] на модифицированных хитозаном НЧ селена. Разработка конъюгированных НЧ селена включает различные соединения: аденозинтрифосфат (АТФ) [42], полисахариды спирулины [43], грибные полисахариды [44], полисахариды *Gracilaria lemaneiformis* [45], полисахаридно-белковый комплекс *Polyporus rhinoceros* [46], полисахариды *Undaria pinnatifida* [47], сиаловая кислота [48, 64], куркумин [49], аминокислоты – валин, аспарагиновая кислота и лизин [50], рутений-тиол [51, 52], полиэтиленгликоль [8, 53], 11-меркапто-1-ундеканол [30], трансферрин [31], 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота (Trolox) [54] и фолат [36]. Одна из основных целей конъюгации НЧ селена заключается в возможности направленной доставки лекарственных препаратов.

В исследовании *in vivo* Huang [31] рассматривал селективное клеточное поглощение и индукцию апоптоза НЧ селена и их потенциальное использование в качестве системы доставки лекарственных средств, нацеленных на рак. НЧ селена синтезировали из селенита натрия (Na_2SeO_3) и конъюгировали с трансферрином (Tf), хитозаном (CS), и загружали доксорубицином (DOX) с образованием Tf-CS-DOX-SeNP (сферическая форма, размер – 130 нм). Клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7 инъецировали мышам. После того, как опухоли увеличились до объема 50–75 мм³, мышам внутривенно вводили 2,5; 5,0 и 7,5 мг/кг Tf-CS-DOX-SeNP каждые 2 дня. Результаты показали уменьшение объема и массы опухоли без значительного снижения массы тела у мышей, которым вводили Tf-CS-DOX-SeNP по сравнению с мышами, которым вводили только физиологический раствор. Это свидетельствует о том, что Tf-CS-DOX-SeNP ингибировали пролиферацию клеток MCF-7 в зависимости от дозы. Хотя предполагается, что поддержание массы тела указывает на минимальные побочные эффекты Tf-CS-DOX-SeNP. Однако возможно 16 дней – это слишком короткий период времени для изучения побочных эффектов НЧ селена без анализа других параметров для определения самочувствия мышей. Отмечены два механизма доставки Tf-CS-DOX-SeNPs, нацеленных на раковые клетки: 1) Tf-лиганд нацелен на раковые клетки со сверхэкспрессией рецепторов Tf, усиливается клеточное поглощение DOX (как часть Tf-CS-DOX-SeNPs) через клатрин-опосредованный эндоцитоз и кавеолин-опосредованный эндоцитоз; и 2) Tf-CS-DOX-SeNPs индуцируют внутриклеточное образование активных форм кислорода (АФК), активируя метаболические пути p53 и MAPK, способствующие клеточному апоптозу раковых клеток.

CuI и группа ученых исследовала противоопухолевое действие НЧ селена, синтезированных с использованием экстракта боярышника [38]. Противоопухолевая активность НЧ была изучена с помощью серии анализов на клеточных культурах HepG2 (рак печени человека) и HL02 (нормальные клетки печени). В результате анализ цитотоксичности показал, что раствор НЧ селена с экстрактом боярышника имеет значительную противоопухолевую активность против клеток HepG2. Исследование противоопухолевых механизмов продемонстрировало, что апоптоз, вызванный НЧ селена с экстрактом боярышника, опосредуется через митохондриальный путь с активацией АФК и нарушением митохондриального мембранного потенциала.

Учеными из Китая были проведены исследования на противоопухолевую активность модифицированных катехинами селеновые гидроксипатитовые НЧ [39]. Анализ клеточного поглощения проводили на клеточной линии остеосаркомы человека MNNG/HOS. Для исследования безопасности разработанных НЧ их токсический эффект, определяли по отношению к стволовым клеткам (hBMSC). Анализ клеточной токсичности показал, что модификация катехинов улучшает противоопухолевую активность НЧ селен-гидроксипатит, индуцируя апоптоз клеточных линий остеосаркомы человека посредством генерации АФК, которые, в свою очередь, активируют путь каспазы-3, не оказывая значительного влияния на рост человеческих нормальных стволовых клеток костного мозга.

Исследователи из России получали конъюгаты НЧ селена с использованием силимарина (гепатопротектор растительного происхождения). Цитотоксические исследования проводили на клеточных линиях SPEV-2 (иммortalизованные клетки почки эмбриона свиньи) и Hep-2 (опухолевые клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека). В результате полученный конъюгат НЧ селена с силимарином проявлял ярко выраженный цитотоксический эффект по отношению к линии опухолевых клеток Hep-2 с уменьшением количества жизнеспособных клеток примерно в 6,5 раза по сравнению с контролем (против примерно 2,3-кратного снижения этого показателя в линии клеток SPEV-2) [55].

Получение наночастиц селена

Для получения НЧ селена используют различные методы: физические, химические и биологические. Наиболее часто используемыми физическими методами синтеза НЧ селена являются гидротермальная обработка, микроволновое облучение и лазерная абляция. Синтез НЧ селена методом импульсной лазерной абляции проводится с использованием жидкой фазы в деионизированной воде. В результате получается коллоидный раствор с разными размерами частиц сферической формы [56, 57]. Лазерная абляция имеет преимущества по сравнению с другими методами – отсутствие загрязнения химическими реагентами, дешевое оборудование, легкий способ получения НЧ и высокая стабильность.

Метод синтеза НЧ селена с помощью микроволн заключается в нагреве водного раствора соли селена с помощью этого излучения [58]. Время реакции, мощность облучения и тип поверхностно-активного вещества оказывают существенное влияние на морфологию и размер наночастиц продукта при применении микроволнового метода [59].

Для химического синтеза НЧ селена используются разные подходы. Однако наиболее распространенным методом синтеза является химическое восстановление и стабилизация различными химическими агентами [60, 61]. Для синтеза НЧ селена химическим путем в качестве прекурсора используется неорганический селен. Модификация поверхности или использование различных укупорочных средств, таких как хитозан или карбоксиметилхитозан, может привести к увеличению размера частиц и увеличению стабильности [62, 63]. В случае кислотно-индуцированного синтеза в качестве индукторов могут быть использованы различные органические кислоты. Например, сиаловая кислота [64]; аскорбиновая кислота [65]; фолиевая кислота [66]; уксусная, щавелевая, галловая кислоты [67]; бензойная кислота [68].

В последние годы биосинтез НЧ с использованием растительных экстрактов и микроорганизмов стал возможной альтернативой химическим и физическим методам [69]. Микроорганизмы могут применяться в качестве потенциальных биореакторов для получения НЧ селена различных форм и размеров. Успешно были синтезированы НЧ селена с помощью таких микроорганизмов, как *Zooglea ramigera* (размер частиц 30–150 нм, частицы сферической формы, имеющие кристаллическую природу) [70], *Gliocladium roseum* (размер частиц 20–80 нм, имеют гексагональную кристаллическую природу) [71], *Lactobacillus Acidophilus* (частицы размером 15–50 нм) [72], *Bacillus cereus* (размер наносфер 150–200 нм) [73] и др.

Растительные экстракты могут использоваться в качестве восстановителей и стабилизаторов. CuI и другие соавторы разработали метод синтеза НЧ селена с помощью водного экстракта плодов боярышника. Полученные НЧ имели монодисперсную сферическую морфологию и были достаточно стабильны в водном растворе со средним диаметром 113 нм [38]. Листья *Terminalia arjuna* были использованы также для приготовления НЧ селена. Экстракт листьев работал как хорошее укупорочное средство, а также как стабилизирующий агент [74].

Методы исследования взаимодействия наночастиц селена с клетками

Трансмиссионная электронная микроскопия

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) используется для визуализации пространственных отношений между НЧ и клетками. [69, 75]. В частности, Dongdong Sun с соавторами исследовали взаимодействия НЧ селена, модифицированных полипириди-

лом рутения(II) размером 100 нм с эндотелиальными клетками пупочной вены человека HUVEC и клетками гепатоцеллюлярной карциномы печени человека HepG2 [51]. В результате было обнаружено, что НЧ селена проникали в клетки путем эндоцитоза, были локализованы преимущественно в цитоплазме и в перинуклеарном пространстве клетки, взаимодействуя с белками и вызывая изменение формы ядра.

Xiaoxiao Song и др. с помощью ТЭМ изучали клеточное поглощение и внутриклеточное распределение НЧ селена, модифицированных хитозаном в клетках HepG2 [76]. НЧ селена были локализованы во внутриклеточных структурах, таких как эндосомы и лизосомы.

В работе [39] с помощью ТЭМ проводили анализ клеточного поглощения гидроксипатитовых НЧ селена, модифицированных катехинами, клетками остеосаркомы человека MNNG/HOS. Было обнаружено, что НЧ проникали в клетки посредством типичного процесса эндоцитоза. Изображения ТЭМ иллюстрируют: инвагинацию клеточной мембраны, за которой следует образование эндосом; вновь созданные эндосомы, загруженные НЧ; первичную лизосому в сочетании с эндосомой; разложение и высвобождение активных агентов; деградацию наночастиц во вторичной лизосоме; НЧ в непосредственной близости от ядра.

Таким образом, ТЭМ позволяет визуализировать НЧ, связанные с электронными плотными метками в различных везикулярных структурах. С помощью ТЭМ, благодаря высокому разрешению и визуализации НЧ во внутриклеточной среде, можно получить информацию о морфологических изменениях клеточных мембран при контакте с НЧ и поглощении НЧ клетками, о взаимодействиях НЧ с клеточными органеллами и их возможное повреждающее действие на них. Также возможно получение информации о накоплении НЧ Se в клетках и их деградации с последующим выведением из клеток.

ТЭМ имеет также и недостатки. Для подготовки образцов, которые исследуются в условиях сверхвысокого вакуума (УСВ), требуется их фиксация, так как высокая энергетическая доза электронного луча несовместима с жизнью клетки. Следовательно, изучение клеток в живом состоянии и исследования динамических событий невозможны [77]. Кроме того, выбор пробоподготовки должен быть тщательно скорректирован с учетом стабильности полимерных НЧ в ответ на гидрофобные и высокореактивные химические вещества, используемые для встраивания и химической фиксации клеток. Электронная микроскопия представляет собой метод, который обычно не предназначен для высокопроизводительных исследований. Поэтому тщательный анализ статистических данных, полученных на основе изображений ТЭМ, может повысить достоверность интерпретации воздействия НЧ на клетки. Число частиц, локализованное в органеллах, может подчеркнуть предполагаемые механизмы и, таким образом, повысить значимость полученных данных [78, 79]. В качестве предварительного

исследования взаимодействия НЧ с клетками может использоваться метод темнопольной микроскопии (ТМ) [78]. Для подтверждения результатов ТЭМ применяется метод конфокальной микроскопии [51].

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) включает в себя конъюгирование различных флуоресцентных меток с белком и НЧ, что позволяет анализировать распределение цвета или резонансного переноса энергии флуоресценции по всему клеточному компартменту. Изучение клеточного поглощения, распределения и локализацию НЧ селена с помощью КЛСМ описывается в работах [34, 47, 51, 64, 76].

Преимущество такого подхода заключается в том, что он позволяет выявлять локализацию НЧ селена в живых клетках. Ограничением этого метода является то, что маркеры эндоцитоза недостаточно селективны по отношению к специфическим путям циркуляции и могут использовать различные механизмы эндоцитоза в различных типах клеток.

Основными достоинствами КЛСМ является существенное увеличение контрастности изображения. Это достигается за счет применения сфокусированной подсветки в области анализа и диафрагмирования излучения в плоскости наблюдения. Такое увеличение контрастности приводит к возможности разрешения объектов, имеющих разницу в интенсивности до 200:1, а также обеспечивает повышение разрешения как в плоскости объекта, так и вдоль оптической оси. Путём смещения объекта относительно фокальной плоскости конфокальный микроскоп позволяет сканировать послойно объект. Очевидное преимущество такой системы в том, что нет необходимости разрезать объект на слои и фиксировать их, а это всегда ведёт к разрушению клеток объекта и изменению их характеристик [80].

Jarockyte с соавторами проводили исследования при различных методах культивирования клеток [81]. Авторы изучали накопление квантовых точек в клеточном монослое и 3D-сфероиде (сфероидальная трехмерная модель клеточной культуры). 3D-сфероиды представляют собой компактные агрегаты клеток с клеточно-матричным и межклеточным взаимодействиями. Диаметры клеточных сфероидов варьировались в диапазоне от 150–200 мкм. Несмотря на то, что было достигнуто лучшее разрешение и увеличенное проникновение света по оси z, визуализация была ограничена до 50–60 мкм, что также является хорошим результатом.

Tianfeng Chen с соавторами изучали изменения плазматической мембраны клеток меланомы человека A375 НЧ селена (44–92 нм), модифицированными полисахаридом *Undaria pinnatifida* [47]. После инкубации с НЧ селена клетки окрашивали аннексином-V-FLUOS/PI. Образцы были непосредственно проанализированы с

помощью конфокальной микроскопии. Флуоресцентные изображения показывают транслокацию фосфатидилсерина в клетках A375, подвергнутых воздействию НЧ селена в течение 24 часов.

КЛСМ чаще всего используют для визуализации поглощения НЧ селена клетками. Однако КЛСМ в сочетании с ТЭМ можно использовать и для количественного определения интернализированных НЧ в клетках [79]. Rothen-Rutishauser с соавторами для изучения интернализации НЧ золота (≈ 13 нм), покрытых полимером Поли (изобутилен-АЛТ-малеиновый ангидрид) и меченых флуоресцентным красителем в альвеолярных опухолевых клетках A549, по отношению к различным механизмам поглощения использовали КЛСМ для получения стереологической информации о клетках. Изображения КЛСМ показывают количество частиц, т. е. количество флуоресцентных пятен, соответствующих маркировке НЧ, которые, скорее всего, представляют собой заполненные эндосомы, внутри клеточной оболочки. Они применили ингибиторы для блокирования различных путей поглощения и сравнили данные о количестве НЧ золота в клетке, полученные с помощью КЛСМ, с данными, полученными на основе изображений ТЭМ. Результаты показали, что средний флуоресцентный сигнал соответствует кластеру из 150 НЧ. Был определен основной путь поглощения, это кавеол-опосредованный эндоцитоз. Основным фактором являлось то, что $\approx 95\%$ частиц локализовалось в везикулах в контроле, а также в обработанных ингибитором клетках [79].

Количественное определение наночастиц селена в клетках

В исследованиях по изучению различных НЧ селена широко применяется метод определения количества НЧ селена в клетках с применением флуоресцентного считывателя для микропланшетов или проточного цитофлуориметра [5, 6, 30, 31, 42, 44, 45, 48, 50, 53, 82]. Клетки инкубируют в течение различного времени в планшете с НЧ селена, загруженными флуоресцентным красителем кумарин-6. После чего клетки промывают трижды холодным натрий-фосфатным буфером (PBS), чтобы удалить НЧ вне клеток и лизируют раствором Тритона с гидроксидом натрия. Клеточное поглощение выражается в процентах интенсивности флуоресценции кумарина-6 в тестируемых лунках по сравнению с флуоресценцией в лунках с положительным контролем.

Концентрацию селена в клетках определяют с помощью таких аналитических методов, как масс-спектрометрия (ICP-MS) или атомно-эмиссионная спектроскопия (ICP-AES) с индуктивно-связанной плазмой [6, 42, 48].

Проточная цитофлуориметрия

Проточная цитофлуориметрия широко применяется для исследования взаимодействия НЧ селена с клетками [34, 47, 83, 84]. С помощью проточной цито-

флуориметрии определяется флуоресценция НЧ селена, обработанных флуоресцентным красителем и поглощенных клетками. Таким образом можно посчитать процентное содержание НЧ в клетках. Обработка клеток специфическими ингибиторами позволяет определить тип поглощения. Использование флуоресцентных красителей, которые способны связываться с определенными компонентами клеток, позволяет изучать механизм клеточной гибели: апоптоз, некроз, аутофагия. По состоянию клеточной культуры данным методом определяют воздействие НЧ на пролиферацию и клеточный цикл. Ранним маркером процесса апоптоза в клетках является трансмембранный потенциал митохондрий. В данном случае используются катионные красители, которые проникают через мембрану клетки и образуют агрегаты в митохондриях. Флуоресценцию таких красителей также определяют проточным цитофлуориметром.

Проточный цитофлуориметр позволяет анализировать индивидуальные клетки в суспензии. При этом суспензия клеток облучается одним или несколькими лазерами таким образом, что позволяет детектировать светорассеяние каждой клетки, в прямом и боковом направлениях. Вместе с сигналом светорассеяния детектируется сигнал флуоресценции. Несколько флуорофоров могут быть обнаружены одновременно с использованием различных фильтров и комбинаций лазеров. Проточный цитофлуориметр обеспечивает измерение до нескольких десятков тысяч клеток в секунду, при этом для каждой клетки, в зависимости от конструкции прибора, может измеряться от 5 до 14 и более параметров [85].

С помощью проточной цитофлуориметрии можно изучать поглощение НЧ селена клетками [86]. Hongyan Li с соавторами исследовали НЧ селена, стабилизированные полисахаридом 1,6- α -D-глюкан (размер $53,7 \pm 4,0$ нм). Роковые клетки шейки матки человека HeLa инкубировали с НЧ селена обработанными флуоресцентным красителем кумарином-6 в течение разного времени (1, 2, 4, 8 и 12 ч). После инкубации клетки промывали трижды PBS и измеряли интенсивность флуоресценции НЧ селена на проточном цитофлуориметре.

Изучение цитотоксического действия наночастиц селена на клетки

Клеточные культуры являются одними из самых распространенных тест-систем для определения токсичности различных препаратов, в том числе и на основе НЧ селена. Такие эксперименты имеют очевидные преимущества. Клеточные культуры являются легко доступными, при этом количество используемого вещества на порядок ниже. Методы определения токсичности НЧ на клеточных культурах основаны на определении жизнеспособности клеток [23]. Для оценки митохондриальной дыхательной активности клеток после воздействия НЧ применяется МТТ-анализ.

Определение цитотоксичности НЧ селена с помощью МТТ-анализа можно рассмотреть на примере работы Haiying Luo [83]. Авторы исследовали токсичность НЧ селена размером 133 нм на клеточных линиях рака шейки матки человека HeLa и рака молочной железы человека MDA-MB-231. Клетки инкубируются с (4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромидом (МТТ), который восстанавливается клеточными ферментами и образует водонерастворимый формазан. Количество формазана коррелирует с количеством жизнеспособных клеток. Интенсивность окраски раствора формазана определяется с помощью спектрофотометра при длине волны 570 нм.

Недостатком такого метода является то, что нельзя определить абсолютную летальную концентрацию, поскольку какая-то часть МТТ-реагента восстанавливается внеклеточными ферментами. На практике дыхательную активность менее 10 % условно принимают за LC_{100} [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных позволяет сделать выводы об актуальности исследований взаимодействия наночастиц селена с живыми клетками. Это необходимо для определения механизмов поглощения наночастиц селена, изучения их цитотоксического и/или цитостатического действия, распределения в клетках. Исследования биологического взаимодействия наночастиц селена с опухолевыми и нормальными клетками позволит определить наиболее информативные методы регистрации и количественной оценки их противоопухолевой активности, что актуально при разработке новых лекарственных средств против рака.

ЛИТЕРАТУРА

- Agarwal V., Bajpai M., Sharma A. Patented and approval scenario of nanopharmaceuticals with relevancy to biomedical application, manufacturing procedure and safety aspects. *Recent patents on drug delivery & formulation*. 2018; 12(1): 40–52. DOI: 10.2174/1872211312666180105114644.
- Gehr P., Zellner R. Biological Responses to Nanoscale Particles. *Springer Nature Switzerland AG*. Cham, Switzerland. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-12461-8>.
- Zhang J., Wang X., Xu T. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with se-methylselenocysteine in mice. *Toxicological sciences*. 2008; 101(1): 22–31. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm221>.
- Zhang J. S., Gao X. Y., Zhang L. D. et al. Biological effects of a nano red elemental selenium. *Biofactors*. 2001; 15(1): 27–38. DOI: 10.1002/biof.5520150103.
- Yu B., Zhang Y., Zheng W. et al. Positive surface charge enhances selective cellular uptake and anticancer efficacy of selenium nanoparticles. *Inorganic chemistry*. 2012; 51(16): 8956–8963. DOI: <https://doi.org/10.1021/ic301050v>.
- Xia Y., You P., Xu F. et al. Novel functionalized selenium nanoparticles for enhanced anti-hepatocarcinoma activity in vitro. *Nanoscale research letters*. 2015; 10(1): 1–14. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11671-015-1051-8>.
- Bhattacharjee A., Basu A., Biswas J. et al. Chemoprotective and chemosensitizing properties of selenium nanoparticle (Nano-Se) during adjuvant therapy with cyclophosphamide in tumor-bearing mice. *Molecular and cellular biochemistry*. 2017; 424(1-2): 13–33.
- Mary T. A., Shanthi K., Vimala K. et al. PEG functionalized selenium nanoparticles as a carrier of crocin to achieve anticancer synergism. *Rsc Advances*. 2016; 6(27): 22936–22949.
- Khurana A., Tekula S., Saifi M. A. et al. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019; 111: 802–812. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.146>.
- Beckett G. J., Arthur J. R. Selenium and endocrine systems. *Journal of endocrinology*. 2005; 184(3): 455–465. DOI: <https://doi.org/10.1677/joe.1.05971>.
- Rotruck J. T., Pope A. L., Ganther H. E. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973; 179(4073): 588–590. DOI: 10.1126/science.179.4073.588.
- Степанов Ю. М., Белицкий В. В., Косинская С. В. Селен как микроэлемент: характеристика и значение для человека. *Сучасна гастроентерологія*. 2012; 65(3): 91–96.
- Бирюкова Е. В. Современный взгляд на роль селена в физиологии и патологии щитовидной железы. *Эффективная фармако-терапия*. 2017; 8: 34–41.
- Guan B., Yan R., Li R. et al. Selenium as a pleiotropic agent for medical discovery and drug delivery. *International journal of nanomedicine*. 2018; 13: 7473. DOI: 10.2147/IJN.S181343.
- Jayaprakash V., Marshall J. R. Selenium and other antioxidants for chemoprevention of gastrointestinal cancers. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2011; 25(4-5): 507–518. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.09.006>.
- Регистр лекарственных средств России. Available at: https://www.rlsnet.ru/baa_tn_id_23728.htm (accessed 22.04.2020).
- Селен. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. – Женева: ВОЗ. 1989; 58: 270.
- Методические рекомендации «Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации»: МР 2.3.1.2432-08 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 18 декабря 2008 г.).
- Третьяк Л. Н., Герасимов Е. М. Специфика влияния селена на организм человека и животных (применительно к проблеме создания селеносодержащих продуктов питания). *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2007: 12.
- Карпова Е. А., Демиденко О. К., Ильина О. П. К вопросу о токсичности препаратов на основе наноселена. *Вестник Красноярского государственного аграрного университета*. 2014: 4.
- Храмцов А. Г., Серов А. В., Тимченко В. П. и др. Новый биологически активный препарат на основе наночастиц селена. *Вестник Северо-Кавказского федерального университета*. 2010; 4: 122–125.
- Патент RU 2392944. Препарат для лечения и профилактики нарушения обмена селена для сельскохозяйственных животных / В. А. Оробец, А. В. Серов, В. А. Беляев, И. В. Киреев, М. В. Мирошниченко; патентообладатель Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Ставропольский государственный аграрный университет. – Заявл. 18.09.2008; опубл. 27.06.2010.
- Прилепский А. Ю., Дроздов А. С., Богатырев В. А., Староверов С. А. Методы работы с клеточными культурами и определение токсичности наноматериалов. СПб: *Университет ИТМО*. 2019: 43.
- Jia X., Li N., Chen J. A subchronic toxicity study of elemental Nano-Se in Sprague-Dawley rats. *Life sciences*. 2005; 76 (17): 1989–2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.09.026>.
- Wang H., Zhang J., Yu H. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007; 42(10): 1524–1533. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.013>.
- Zhang J., Wang H., Peng D. et al. Further insight into the impact of sodium selenite on selenoenzymes: high-dose selenite enhances hepatic thioredoxin reductase 1 activity as a consequence of liver injury. *Toxicology letters*. 2008; 176(3): 223–229. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.12.002>.
- Kong L., Yuan Q., Zhu H. et al. The suppression of prostate LNCaP cancer cells growth by Selenium nanoparticles through Akt/Mdm2/AR controlled apoptosis. *Biomaterials*. 2011; 32(27): 6515–6522. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.032>.

28. Tran P. A., Webster T. J. Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth. *International journal of nanomedicine*. 2011; 6: 1553. DOI: 10.2147/IJN.S21729.
29. Wang H., Wei W., Zhang S. Y. et al. Melatonin-selenium nanoparticles inhibit oxidative stress and protect against hepatic injury induced by *Bacillus Calmette–Guérin*/lipopolysaccharide in mice. *Journal of pineal research*. 2005; 39(2): 156–163. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00231.x>.
30. Li Y., Li X., Wong Y. S. et al. The reversal of cisplatin-induced nephrotoxicity by selenium nanoparticles functionalized with 11-mercapto-1-undecanol by inhibition of ROS-mediated apoptosis. *Biomaterials*. 2011; 32(34): 9068–9076. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.001>.
31. Huang Y., He L., Liu W. et al. Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles. *Biomaterials*. 2013; 34(29): 7106–7116. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.067>.
32. Kumar G. S., Kulkarni A., Khurana A. et al. Selenium nanoparticles involve HSP-70 and SIRT1 in preventing the progression of type 1 diabetic nephropathy. *Chemico-biological interactions*. 2014; 223: 125–133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.017>.
33. Huang B., Zhang J., Hou J. et al. Free radical scavenging efficiency of Nano-Se in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003; 35(7): 805–813. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00428-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00428-3).
34. Nasrolahi Shirazi A., Tiwari R. K., Oh D. et al. Cyclic peptide–selenium nanoparticles as drug transporters. *Molecular pharmaceutics*. 2014; 11(10): 3631–3641. DOI: <https://doi.org/10.1021/mp500364a>.
35. Loeschner K., Hadrup N., Hansen M. et al. Absorption, distribution, metabolism and excretion of selenium following oral administration of elemental selenium nanoparticles or selenite in rats. *Metallomics*. 2014; 6(2): 330–337. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3MT00309D>.
36. Pi J., Jin H., Liu R. et al. Pathway of cytotoxicity induced by folic acid modified selenium nanoparticles in MCF-7 cells. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013; 97(3): 1051–1062.
37. Gao F., Yuan Q., Gao L. et al. Cytotoxicity and therapeutic effect of irinotecan combined with selenium nanoparticles. *Biomaterials*. 2014; 35(31): 8854–8866. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.004>.
38. Cui D., Liang T., Sun L. et al. Green synthesis of selenium nanoparticles with extract of hawthorn fruit induced HepG2 cells apoptosis. *Pharmaceutical Biology*. 2018; 56(1): 528–534. DOI: <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1510974>.
39. Khan S., Ullah M. W., Siddique R. et al. Catechins-modified selenium-doped hydroxyapatite nanomaterials for improved osteosarcoma therapy through generation of reactive oxygen species. *Frontiers in oncology*. 2019; 9: 499. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00499>.
40. Wang Y., Wang J., Hao H. et al. *In vitro* and *in vivo* mechanism of bone tumor inhibition by selenium-doped bone mineral nanoparticles. *ACS nano*. 2016; 10(11): 9927–9937. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b03835>.
41. Yazdi M. H., Mahdavi M., Faghfuri E. et al. Th1 immune response induction by biogenic selenium nanoparticles in mice with breast cancer: preliminary vaccine model. *Iranian journal of biotechnology*. 2015; 13(2): 1. DOI: 10.15171/ijb.1056.
42. Zhang Y., Li X., Huang Z. et al. Enhancement of cell permeabilization apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles by ATP surface decoration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2013; 9(1): 74–84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.04.002>.
43. Trickler W. J., Lantz S. M., Schrand A. M. et al. Effects of copper nanoparticles on rat cerebral microvessel endothelial cells. *Nanomedicine*. 2012; 7(6): 835–846. DOI: 10.2217/nnm.11.154.
44. Wu H., Li X., Liu W. et al. Surface decoration of selenium nanoparticles by mushroom polysaccharides–protein complexes to achieve enhanced cellular uptake and antiproliferative activity. *Journal of Materials Chemistry*. 2012; 22(19): 9602–9610. DOI: <https://doi.org/10.1039/C2JM16828F>.
45. Jiang W., Fu Y., Yang F. et al. *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide as integrin-targeting surface decorator of selenium nanoparticles to achieve enhanced anticancer efficacy. *ACS applied materials & interfaces*. 2014; 6(16): 13738–13748. DOI: <https://doi.org/10.1021/am5031962>.
46. Wu H., Zhu H., Li X. et al. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in A549 human lung adenocarcinoma cells by surface-capping selenium nanoparticles: an effect enhanced by polysaccharide–protein complexes from *Polyporus rhinoceros*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013; 61(41): 9859–9866. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf403564s>.
47. Chen T., Wong Y. S., Zheng W. et al. Selenium nanoparticles fabricated in *Undaria pinnatifida* polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 2008; 67(1): 26–31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.07.010>.
48. Zheng J. S., Zheng S. Y., Zhang Y. B. et al. Sialic acid surface decoration enhances cellular uptake and apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011; 83(1): 183–187. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.11.023>.
49. Kumari M., Ray L., Purohit M. P. et al. Curcumin loading potentiates the chemotherapeutic efficacy of selenium nanoparticles in HCT116 cells and Ehrlich's ascites carcinoma bearing mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017; 117: 346–362. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.05.003>.
50. Feng Y., Su J., Zhao Z. et al. Differential effects of amino acid surface decoration on the anticancer efficacy of selenium nanoparticles. *Dalton Transactions*. 2014; 43(4): 1854–1861. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3DT52468J>.
51. Sun D., Liu Y., Yu Q. et al. The effects of luminescent ruthenium (II) polypyridyl functionalized selenium nanoparticles on bFGF-induced angiogenesis and AKT/ERK signaling. *Biomaterials*. 2013; 34(1): 171–180. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.031>.
52. Sun D., Liu Y., Yu Q. et al. Inhibition of tumor growth and vasculature and fluorescence imaging using functionalized ruthenium-thiol protected selenium nanoparticles. *Biomaterials*. 2014; 35(5): 1572–1583. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.007>.
53. Zheng S., Li X., Zhang Y. et al. PEG-nanolized ultrasmall selenium nanoparticles overcome drug resistance in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through induction of mitochondria dysfunction. *International journal of nanomedicine*. 2012; 7: 3939. DOI: 10.2147/IJN.S30940.
54. Li Y., Li X., Zheng W. et al. Functionalized selenium nanoparticles with nephroprotective activity, the important roles of ROS-mediated signaling pathways. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013; 1(46): 6365–6372. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3TB21168A>.
55. Староверов С. А., Дыкман Л. А., Меженный П. В. и др. Получение наночастиц селена с использованием силимарина и изучение их цитотоксичности по отношению к опухолевым клеткам. *Сельскохозяйственная биология*. 2017; 52(6): 1206–1213. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.6.1206rus.
56. Quintana M., Haro-Poniatowski E., Morales J. et al. Synthesis of selenium nanoparticles by pulsed laser ablation. *Applied surface science*. 2002; 195(1-4): 175–186. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(02\)00549-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(02)00549-4).
57. Guisbiers G., Wang Q., Khachatryan E. et al. Anti-bacterial selenium nanoparticles produced by UV/VIS/NIR pulsed nanosecond laser ablation in liquids. *Laser Physics Letters*. 2014; 12(1): 016003. DOI: 10.1088/1612-2011/12/1/016003.
58. Hou J. Y., Ai S. Y., Shi W. J. Preparation and characterization of nano-Se/silk fibroin colloids. *Chemical Research in Chinese Universities*. 2011; 27(1): 158–160.
59. Panahi-Kalamuei M., Salavati-Niasari M., Hosseinpour-Mashkani S. M. Facile microwave synthesis, characterization, and solar cell application of selenium nanoparticles. *Journal of alloys and compounds*. 2014; 617: 627–632. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.07.174>.
60. Petros R. A., DeSimone J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature reviews Drug discovery*. 2010; 9(8): 615–627. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd2591>.
61. Dhand C., Dwivedi N., Loh X. J. et al. Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview. *Rsc Advances*. 2015; 5(127): 105003–105037. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5RA19388E>.
62. Chen W., Li Y., Yang S. et al. Synthesis and antioxidant properties of chitosan and carboxymethyl chitosan-stabilized selenium nanoparticles. *Carbohydrate polymers*. 2015; 132: 574–581. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.064>.

63. Zhang C., Zhai X., Zhao G. et al. Synthesis, characterization, and controlled release of selenium nanoparticles stabilized by chitosan of different molecular weights. *Carbohydrate polymers*. 2015; 134: 158–166. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.065>.
64. Yin T., Yang L., Liu Y. et al. Sialic acid (SA)-modified selenium nanoparticles coated with a high blood–brain barrier permeability peptide-B6 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *Acta biomaterialia*. 2015; 25: 172–183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.035>.
65. Bartůněk V., Junková J., Šuman J. et al. Preparation of amorphous antimicrobial selenium nanoparticles stabilized by odor suppressing surfactant polysorbate 20. *Materials Letters*. 2015; 152: 207–209. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.03.092>.
66. Liu T., Zeng L., Jiang W. et al. Rational design of cancer-targeted selenium nanoparticles to antagonize multidrug resistance in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015; 11(4): 947–958. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.009>.
67. Dwivedi C., Shah C.P., Singh K. et al. An organic acid-induced synthesis and characterization of selenium nanoparticles. *Journal of Nanotechnology*. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1155/2011/651971>.
68. Kumar S., Tomar M. S., Acharya A. Carboxylic group-induced synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its anti-tumor potential on Dalton's lymphoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015; 126: 546–552. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.009>.
69. Questera K., Avalos-Borjab M., Castro-Longoria E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*. 2013; 54: 1–27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.07.003>.
70. Srivastava N., Mukhopadhyay M. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles mediated by *Zoogaea ramigera*. *Powder technology*. 2013; 244: 26–29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.03.050>.
71. Srivastava N., Mukhopadhyay M. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles using *Gliocladium roseum*. *Journal of Cluster Science*. 2015; 26(5): 1473–1482. DOI: 10.1007/s10876-014-0833-y.
72. Visha P., Nanjappan K., Selvaraj P. et al. Biosynthesis and structural characteristics of selenium nanoparticles using *Lactobacillus Acidophilus* bacteria by wet sterilization process. *International Journal of Advanced Veterinary Science and Technology*. 2015; 4(1): 178–183. DOI: 10.23953/cloud.ijavst.183.
73. Dhanjal S., Cameotra S. S. Aerobic biogenesis of selenium nanoparticles by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microbial cell factories*. 2010; 9: 52. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-52>.
74. Prasad K. S., Selvaraj K. Biogenic synthesis of selenium nanoparticles and their effect on As (III)-induced toxicity on human lymphocytes. *Biological trace element research*. 2014; 157(3): 275–283. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9891-0>.
75. Reifarth M., Hoeppener S., Schubert U. S. Uptake and intracellular fate of engineered nanoparticles in mammalian cells: capabilities and limitations of transmission electron microscopy-polymer-based nanoparticles. *Advanced Materials*. 2018; 30(9): 1703704. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.201703704>.
76. Song X., Chen Y., Zhao G., Sun H., Che H., & Leng, X. Effect of molecular weight of chitosan and its oligosaccharides on antitumor activities of chitosan-selenium nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 2020; 231: 115689. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115689>.
77. De Jonge N., Peckys D. B. Live cell electron microscopy is probably impossible. *ACS nano*. 2016; 10(10): 9061–9063. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b02809>.
78. Rosman C., Pierrat S., Henkel A. et al. A new approach to assess gold nanoparticle uptake by mammalian cells: combining optical dark-field and transmission electron microscopy. *Small*. 2012; 8(23): 3683–3690. DOI: <https://doi.org/10.1002/sml.201200853>.
79. Rothen-Rutishauser B., Kuhn D. A., Ali Z. et al. Quantification of gold nanoparticle cell uptake under controlled biological conditions and adequate resolution. *Nanomedicine*. 2014; 9(5): 607–621. DOI: 10.2217/nmm.13.24.
80. Лазерная конфокальная микроскопия. Методические указания / Сост. Тимченко П. Е., Тимченко Е. В. Самара: Изд-во Самарского государственного аэрокосмического университета имени академика С. П. Королёва. 2014: 76.
81. Jarockyte G., Dapkute D., Karabanovas V. et al. 3D cellular spheroids as tools for understanding carboxylated quantum dot behavior in tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2018; 1862(4): 914–923. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.12.014>.
82. Luesakul U., Puthong S., Neamati N., Muangsins N. pH-responsive selenium nanoparticles stabilized by folate-chitosan delivering doxorubicin for overcoming drug-resistant cancer cells. *Carbohydrate polymers*. 2018; 181: 841–850. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.068>.
83. Luo H., Wang F., Bai Y., Chen T., Zheng W. Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012; 94: 304–308. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.02.006>.
84. Wang X., Sun K., Tan Y., Wu S., Zhang J. Efficacy and safety of selenium nanoparticles administered intraperitoneally for the prevention of growth of cancer cells in the peritoneal cavity. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 72: 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.003>.
85. Проточная цитофлуориметрия. Учебно-методическое пособие / Сост. Балалаева И. В. Нижний Новгород: Изд-во Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского. 2014: 75.
86. Li H., Liu D., Li S., Xue C. Synthesis and cytotoxicity of selenium nanoparticles stabilized by α -D-glucan from *Castanea mollissima* Blume. *International journal of biological macromolecules*. 2019; 129: 818–826. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.085>.

REFERENCE

1. Agarwal V., Bajpai M., Sharma A. Patented and approval scenario of nanopharmaceuticals with relevancy to biomedical application, manufacturing procedure and safety aspects. *Recent patents on drug delivery & formulation*. 2018; 12(1): 40–52. DOI: 10.2174/1872211312666180105114644.
2. Gehr P., Zellner R. Biological Responses to Nanoscale Particles. *Springer Nature Switzerland AG*. Cham, Switzerland. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-12461-8>.
3. Zhang J., Wang X., Xu T. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with se-methylselenocysteine in mice. *Toxicological sciences*. 2008; 101(1): 22–31. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm221>.
4. Zhang J. S., Gao X. Y., Zhang L. D. et al. Biological effects of a nano red elemental selenium. *Biofactors*. 2001; 15(1): 27–38. DOI: 10.1002/biof.5520150103.
5. Yu B., Zhang Y., Zheng W. et al. Positive surface charge enhances selective cellular uptake and anticancer efficacy of selenium nanoparticles. *Inorganic chemistry*. 2012; 51(16): 8956–8963. DOI: <https://doi.org/10.1021/ic301050v>.
6. Xia Y., You P., Xu F. et al. Novel functionalized selenium nanoparticles for enhanced anti-hepatocarcinoma activity in vitro. *Nanoscale research letters*. 2015; 10(1): 1–14. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11671-015-1051-8>.
7. Bhattacharjee A., Basu A., Biswas J. et al. Chemoprotective and chemosensitizing properties of selenium nanoparticle (Nano-Se) during adjuvant therapy with cyclophosphamide in tumor-bearing mice. *Molecular and cellular biochemistry*. 2017; 424(1–2): 13–33.
8. Mary T. A., Shanthi K., Vimala K. et al. PEG functionalized selenium nanoparticles as a carrier of crocin to achieve anticancer synergism. *Rsc Advances*. 2016; 6(27): 22936–22949.
9. Khurana A., Tekula S., Saifi M. A. et al. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019; 111: 802–812. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.146>.
10. Beckett G. J., Arthur J. R. Selenium and endocrine systems. *Journal of endocrinology*. 2005; 184(3): 455–465. DOI: <https://doi.org/10.1677/joe.1.05971>.
11. Rotruck J. T., Pope A. L., Ganther H. E. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973; 179(4073): 588–590. DOI: 10.1126/science.179.4073.588.
12. Stepanov Yu. M., Belitskiy V. V., Kosinskaya S. V. Selenium as a trace element: characteristics and importance for a human. *Modern gastroenterology*. 2012; 65(3): 91–96. (in Ukraine).

13. Biryukova Ye. V. A Contemporary View on a Role Played by Selenium in Physiology and Pathology of the Thyroid Gland. *Effective Pharmacotherapy*. 2017; 8: 34–41. (in Russ.).
14. Guan B., Yan R., Li R. et al. Selenium as a pleiotropic agent for medical discovery and drug delivery. *International journal of nanomedicine*. 2018; 13: 7473. DOI: 10.2147/IJN.S181343.
15. Jayaprakash V., Marshall J. R. Selenium and other antioxidants for chemoprevention of gastrointestinal cancers. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2011; 25(4-5): 507–518. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.09.006>.
16. Register of medicines of Russia. Available at: https://www.rlsnet.ru/baa_tn_id_23728.htm (accessed 22.04.2020). (in Russ.).
17. Selenium. Hygienic criteria for the state of the environment. – Geneva: WHO. 1989; 58: 270. (in Russ.).
18. Methodological recommendations «Norms of physiological needs in energy and food substances for various groups of the population of the Russian Federation»: MP 2.3.1.2432-08 (utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 18 dekabrja 2008 g.). (in Russ.).
19. Tretyak L. N., Gerasimov E. M. Specificity of the effect of selenium on the human body and animals (in relation to the problem of creating selenium-containing foods). *Bulletin of the Orenburg State University*. 2007; 12. (in Russ.).
20. Karpova E. A., Demidenko O. K., Ilina O. P. The question of the toxicity of drugs on the basis of nanoselenium. *The Bulletin of KrasGAU*. 2014; 4. (in Russ.).
21. Hramcov A. G., Serov A. V., Timchenko V. P. et al. New biologically active preparation on the basis of selenium nanoparticles. *Newsletter of North-Caucasus federal university*. 2010; 4: 122–125. (in Russ.).
22. Patent RU 2392944. Preparation for the treatment and prevention of selenium metabolism disorders for farm animals / V. A. Orobec, A. V. Serov, V. A. Beljaev, I. V. Kireev, M. V. Miroshnichenko; Patent holder Federal State Educational Institution of Higher Professional Education Stavropol State Agrarian University. – Appl. 18.09.2008; publ. 27.06.2010. (in Russ.).
23. Prilepskiy A. Ju., Drozdov A. S., Bogatyrev V. A., Staroverov S. A. Methods of working with cell cultures and determining the toxicity of nanomaterials. St.-Petersburg: ITMO University. 2019; 43. (in Russ.).
24. Jia X., Li N., Chen J. A subchronic toxicity study of elemental Nano-Se in Sprague-Dawley rats. *Life sciences*. 2005; 76 (17): 1989–2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.09.026>.
25. Wang H., Zhang J., Yu H. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007; 42(10): 1524–1533. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.013>.
26. Zhang J., Wang H., Peng D. et al. Further insight into the impact of sodium selenite on selenoenzymes: high-dose selenite enhances hepatic thioredoxin reductase 1 activity as a consequence of liver injury. *Toxicology letters*. 2008; 176(3): 223–229. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.12.002>.
27. Kong L., Yuan Q., Zhu H. et al. The suppression of prostate LNCaP cancer cells growth by Selenium nanoparticles through Akt/Mdm2/AR controlled apoptosis. *Biomaterials*. 2011; 32(27): 6515–6522. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.032>.
28. Tran P. A., Webster T. J. Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth. *International journal of nanomedicine*. 2011; 6: 1553. DOI: 10.2147/IJN.S21729.
29. Wang H., Wei W., Zhang S. Y. et al. Melatonin-selenium nanoparticles inhibit oxidative stress and protect against hepatic injury induced by *Bacillus Calmette–Guérin*/lipopolysaccharide in mice. *Journal of pineal research*. 2005; 39(2): 156–163. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00231.x>.
30. Li Y., Li X., Wong Y. S. et al. The reversal of cisplatin-induced nephrotoxicity by selenium nanoparticles functionalized with 11-mercapto-1-undecanol by inhibition of ROS-mediated apoptosis. *Biomaterials*. 2011; 32(34): 9068–9076. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.001>.
31. Huang Y., He L., Liu W. et al. Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles. *Biomaterials*. 2013; 34(29): 7106–7116. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.067>.
32. Kumar G. S., Kulkarni A., Khurana A. et al. Selenium nanoparticles involve HSP-70 and SIRT1 in preventing the progression of type 1 diabetic nephropathy. *Chemico-biological interactions*. 2014; 223: 125–133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.017>.
33. Huang B., Zhang J., Hou J. et al. Free radical scavenging efficiency of Nano-Se in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003; 35(7): 805–813. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00428-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00428-3).
34. Nasrolahi Shirazi A., Tiwari R. K., Oh D. et al. Cyclic peptide–selenium nanoparticles as drug transporters. *Molecular pharmaceutics*. 2014; 11(10): 3631–3641. DOI: <https://doi.org/10.1021/mp500364a>.
35. Loeschner K., Hadrup N., Hansen M. et al. Absorption, distribution, metabolism and excretion of selenium following oral administration of elemental selenium nanoparticles or selenite in rats. *Metallomics*. 2014; 6(2): 330–337. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3MT00309D>.
36. Pi J., Jin H., Liu R. et al. Pathway of cytotoxicity induced by folic acid modified selenium nanoparticles in MCF-7 cells. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013; 97(3): 1051–1062.
37. Gao F., Yuan Q., Gao L. et al. Cytotoxicity and therapeutic effect of irinotecan combined with selenium nanoparticles. *Biomaterials*. 2014; 35(31): 8854–8866. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.004>.
38. Cui D., Liang T., Sun L. et al. Green synthesis of selenium nanoparticles with extract of hawthorn fruit induced HepG2 cells apoptosis. *Pharmaceutical Biology*. 2018; 56(1): 528–534. DOI: <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1510974>.
39. Khan S., Ullah M. W., Siddique R. et al. Catechins-modified selenium-doped hydroxyapatite nanomaterials for improved osteosarcoma therapy through generation of reactive oxygen species. *Frontiers in oncology*. 2019; 9: 499. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00499>.
40. Wang Y., Wang J., Hao H. et al. *In vitro* and *in vivo* mechanism of bone tumor inhibition by selenium-doped bone mineral nanoparticles. *ACS nano*. 2016; 10(11): 9927–9937. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b03835>.
41. Yazdi M. H., Mahdavi M., Faghfuri E. et al. Th1 immune response induction by biogenic selenium nanoparticles in mice with breast cancer: preliminary vaccine model. *Iranian journal of biotechnology*. 2015; 13(2): 1. DOI: 10.15171/ijb.1056.
42. Zhang Y., Li X., Huang Z. et al. Enhancement of cell permeabilization apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles by ATP surface decoration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2013; 9(1): 74–84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.04.002>.
43. Trickler W. J., Lantz S. M., Schrand A. M. et al. Effects of copper nanoparticles on rat cerebral microvessel endothelial cells. *Nanomedicine*. 2012; 7(6): 835–846. DOI: 10.2217/nnm.11.154.
44. Wu H., Li X., Liu W. et al. Surface decoration of selenium nanoparticles by mushroom polysaccharides–protein complexes to achieve enhanced cellular uptake and antiproliferative activity. *Journal of Materials Chemistry*. 2012; 22(19): 9602–9610. DOI: <https://doi.org/10.1039/C2JM16828F>.
45. Jiang W., Fu Y., Yang F. et al. Gracilaria lemaneiformis polysaccharide as integrin-targeting surface decorator of selenium nanoparticles to achieve enhanced anticancer efficacy. *ACS applied materials & interfaces*. 2014; 6(16): 13738–13748. DOI: <https://doi.org/10.1021/am5031962>.
46. Wu H., Zhu H., Li X. et al. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in A549 human lung adenocarcinoma cells by surface-capping selenium nanoparticles: an effect enhanced by polysaccharide–protein complexes from *Polyporus rhinoceros*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013; 61(41): 9859–9866. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf403564s>.
47. Chen T., Wong Y. S., Zheng W. et al. Selenium nanoparticles fabricated in *Undaria pinnatifida* polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 2008; 67(1): 26–31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.07.010>.
48. Zheng J. S., Zheng S. Y., Zhang Y. B. et al. Sialic acid surface decoration enhances cellular uptake and apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011; 83(1): 183–187. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.11.023>.
49. Kumari M., Ray L., Purohit M. P. et al. Curcumin loading potentiates the chemotherapeutic efficacy of selenium nanoparticles in HCT116 cells and Ehrlich's ascites carcinoma bearing mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017; 117: 346–362. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.05.003>.

50. Feng Y., Su J., Zhao Z. et al. Differential effects of amino acid surface decoration on the anticancer efficacy of selenium nanoparticles. *Dalton Transactions*. 2014; 43(4): 1854–1861. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3DT52468J>.
51. Sun D., Liu Y., Yu Q. et al. The effects of luminescent ruthenium (II) polypyridyl functionalized selenium nanoparticles on bFGF-induced angiogenesis and AKT/ERK signaling. *Biomaterials*. 2013; 34(1): 171–180. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.031>.
52. Sun D., Liu Y., Yu Q. et al. Inhibition of tumor growth and vasculature and fluorescence imaging using functionalized ruthenium-thiol protected selenium nanoparticles. *Biomaterials*. 2014; 35(5): 1572–1583. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.007>.
53. Zheng S., Li X., Zhang Y. et al. PEG-nanolized ultrasmall selenium nanoparticles overcome drug resistance in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through induction of mitochondria dysfunction. *International journal of nanomedicine*. 2012; 7: 3939. DOI: 10.2147/IJN.S30940.
54. Li Y., Li X., Zheng W. et al. Functionalized selenium nanoparticles with nephroprotective activity, the important roles of ROS-mediated signaling pathways. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013; 1(46): 6365–6372. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3TB21168A>.
55. Staroverov S. A., Dykman L. A., Mezhenyi P. V. et al. Preparation of selenium nanoparticles by using silymarin and study of their cytotoxicity to tumor cells. *Agricultural Biology*. 2017; 52(6): 1206–1213. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.6.1206rus (in Russ.).
56. Quintana M., Haro-Poniatowski E., Morales J. et al. Synthesis of selenium nanoparticles by pulsed laser ablation. *Applied surface science*. 2002; 195(1-4): 175–186. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(02\)00549-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(02)00549-4).
57. Guisbiers G., Wang Q., Khachatryan E. et al. Anti-bacterial selenium nanoparticles produced by UV/VIS/NIR pulsed nanosecond laser ablation in liquids. *Laser Physics Letters*. 2014; 12(1): 016003. DOI: 10.1088/1612-2011/12/1/016003.
58. Hou J. Y., Ai S. Y., Shi W. J. Preparation and characterization of nano-Se/silk fibroin colloids. *Chemical Research in Chinese Universities*. 2011; 27(1): 158–160.
59. Panahi-Kalamuei M., Salavati-Niasari M., Hosseinpour-Mashkani S. M. Facile microwave synthesis, characterization, and solar cell application of selenium nanoparticles. *Journal of alloys and compounds*. 2014; 617: 627–632. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.07.174>.
60. Petros R. A., DeSimone J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature reviews Drug discovery*. 2010; 9(8): 615–627. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd2591>.
61. Dhand C., Dwivedi N., Loh X. J. et al. Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview. *Rsc Advances*. 2015; 5(127): 105003–105037. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5RA19388E>.
62. Chen W., Li Y., Yang S. et al. Synthesis and antioxidant properties of chitosan and carboxymethyl chitosan-stabilized selenium nanoparticles. *Carbohydrate polymers*. 2015; 132: 574–581. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.064>.
63. Zhang C., Zhai X., Zhao G. et al. Synthesis, characterization, and controlled release of selenium nanoparticles stabilized by chitosan of different molecular weights. *Carbohydrate polymers*. 2015; 134: 158–166. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.065>.
64. Yin T., Yang L., Liu Y. et al. Sialic acid (SA)-modified selenium nanoparticles coated with a high blood–brain barrier permeability peptide-B6 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *Acta biomaterialia*. 2015; 25: 172–183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.035>.
65. Bartůňek V., Junková J., Šuman J. et al. Preparation of amorphous antimicrobial selenium nanoparticles stabilized by odor suppressing surfactant polysorbate 20. *Materials Letters*. 2015; 152: 207–209. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.03.092>.
66. Liu T., Zeng L., Jiang W. et al. Rational design of cancer-targeted selenium nanoparticles to antagonize multidrug resistance in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015; 11(4): 947–958. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.009>.
67. Dwivedi C., Shah C.P., Singh K. et al. An organic acid-induced synthesis and characterization of selenium nanoparticles. *Journal of Nanotechnology*. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1155/2011/651971>.
68. Kumar S., Tomar M. S., Acharya A. Carboxylic group-induced synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its anti-tumor potential on Dalton's lymphoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015; 126: 546–552. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.009>.
69. Questera K., Avalos-Borjab M., Castro-Longoria E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*. 2013; 54: 1–27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.07.003>.
70. Srivastava N., Mukhopadhyay M. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles mediated by *Zooglea ramigera*. *Powder technology*. 2013; 244: 26–29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.03.050>.
71. Srivastava N., Mukhopadhyay M. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles using *Gliocladium roseum*. *Journal of Cluster Science*. 2015; 26(5): 1473–1482. DOI: 10.1007/s10876-014-0833-y.
72. Visha P., Nanjappan K., Selvaraj P. et al. Biosynthesis and structural characteristics of selenium nanoparticles using *Lactobacillus Acidophilus* bacteria by wet sterilization process. *International Journal of Advanced Veterinary Science and Technology*. 2015; 4(1): 178–183. DOI: 10.23953/cloud.ijavst.183.
73. Dhanjal S., Cameotra S. S. Aerobic biogenesis of selenium nanoparticles by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microbial cell factories*. 2010; 9: 52. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-52>.
74. Prasad K. S., Selvaraj K. Biogenic synthesis of selenium nanoparticles and their effect on As (III)-induced toxicity on human lymphocytes. *Biological trace element research*. 2014; 157(3): 275–283. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9891-0>.
75. Reifarth M., Hoepfner S., Schubert U. S. Uptake and intracellular fate of engineered nanoparticles in mammalian cells: capabilities and limitations of transmission electron microscopy-polymer-based nanoparticles. *Advanced Materials*. 2018; 30(9): 1703704. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.201703704>.
76. Song X., Chen Y., Zhao G., Sun H., Che H., & Leng, X. Effect of molecular weight of chitosan and its oligosaccharides on antitumor activities of chitosan-selenium nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 2020; 231: 115689. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115689>.
77. De Jonge N., Peckys D. B. Live cell electron microscopy is probably impossible. *ACS nano*. 2016; 10(10): 9061–9063. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b02809>.
78. Rosman C., Pierrat S., Henkel A. et al. A new approach to assess gold nanoparticle uptake by mammalian cells: combining optical dark-field and transmission electron microscopy. *Small*. 2012; 8(23): 3683–3690. DOI: <https://doi.org/10.1002/smll.201200853>.
79. Rothen-Rutishauser B., Kuhn D. A., Ali Z. et al. Quantification of gold nanoparticle cell uptake under controlled biological conditions and adequate resolution. *Nanomedicine*. 2014; 9(5): 607–621. DOI: 10.2217/nnm.13.24.
80. Laser confocal microscopy. Guidelines / Comp. Timchenko P. E., Timchenko E. V. Samara: Publishing House Mar State Aerospace University named after academician S. P. Korolev. 2014: 76. (in Russ.).
81. Jarockyte G., Dapkute D., Karabanovas V. et al. 3D cellular spheroids as tools for understanding carboxylated quantum dot behavior in tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2018; 1862(4): 914–923. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.12.014>.
82. Luesakul U., Puthong S., Neamati N., Muangsinn N. pH-responsive selenium nanoparticles stabilized by folate-chitosan delivering doxorubicin for overcoming drug-resistant cancer cells. *Carbohydrate polymers*. 2018; 181: 841–850. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.068>.
83. Luo H., Wang F., Bai Y., Chen T., Zheng W. Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012; 94: 304–308. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.02.006>.
84. Wang X., Sun K., Tan Y., Wu S., Zhang J. Efficacy and safety of selenium nanoparticles administered intraperitoneally for the prevention of growth of cancer cells in the peritoneal cavity. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 72: 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.003>.
85. Flow cytometry. Educational and methodological guide / Comp. Balalaeva I. V. Nizhny Novgorod: Publishing House of the Nizhny Novgorod State University. N. I. Lobachevsky 2014: 75. (in Russ.).
86. Li H., Liu D., Li S., Xue C. Synthesis and cytotoxicity of selenium nanoparticles stabilized by α -D-glucan from *Castanea mollissima* Blume. *International journal of biological macromolecules*. 2019; 129: 818–826. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.085>.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-45-54>
УДК 617-77:615.456.1:615.324:617.3



Обзорная статья/Review article

Особенности растворов гиалуроновой кислоты для внутрисуставного введения и современные тенденции в их разработке (обзор)

Ю. Ю. Загорюлько¹, Е. Ю. Загорюлько^{2*}

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России), 194100, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2

2 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14

*Контактное лицо: Загорюлько Елена Юрьевна. E-mail: elena.zagorulko@pharminnotech.com

Статья получена: 13.02.2020. Статья принята к печати: 13.03.2020

Резюме

Введение. Наиболее распространённым способом поддержания вязкоэластических свойств синовиальной жидкости является внутрисуставное введение растворов гиалуроновой кислоты. Такие формы имеют ряд особенностей, обусловленных способом введения, особенностями субстанции, а также их состава, технологии и упаковки. Целью работы являлся анализ особенностей растворов гиалуроновой кислоты для внутрисуставного введения, а также рассмотрение современных подходов к их фармацевтической разработке.

Текст. В настоящее время в России большая часть таких форм зарегистрирована в качестве медицинских изделий. Каждый препарат имеет свои характеристики, в том числе: источник получения субстанции, основная молекулярная масса и диапазон молекулярных масс гиалуроновой кислоты, структура молекулы (линейная или поперечносшитая), способ её химической модификации, концентрация, объём раствора, режим дозирования и др. В качестве вспомогательных веществ чаще всего используют натрия хлорид, воду для инъекций и фосфатный буферный раствор для поддержания значений pH близких к синовиальной жидкости. Некоторые протезы содержат маннитол в качестве антиоксиданта. Известны комбинации гиалуроновой кислоты с активными субстанциями, обладающими хондропротекторным действием – хондроитина сульфатом, натрия сукцинатом. Основным видом первичной упаковки являются стеклянные преднаполненные шприцы. Выбор способов стерилизации определяется химической структурой гиалуроновой кислоты, для большинства протезов используют асептическое производство.

Заключение. В настоящее время успешно применяются исследовательские решения по созданию термостабильных и устойчивых к действию ферментов композиций с гиалуроновой кислотой для внутрисуставного введения. Современные разработки направлены на создание полимерных комплексов гиалуроновой кислоты с веществами, улучшающими смазывающую способность растворов, разработку наносистем (липосом, наночастиц, наномицелл и др.) с хондропротекторами, а также создание инертных биосовместимых протезов с вязкоупругими свойствами. Создание форм гиалуроновой кислоты и альтернативных препаратов, способных поддерживать реологические свойства синовиальной жидкости, в настоящее время является перспективным направлением исследований.

Ключевые слова: протез синовиальной жидкости, раствор для внутрисуставного введения, медицинское изделие, остеоартроз, гиалуроновая кислота, технология, состав, разработка.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Ю. Ю. Загорюлько осуществлял поиск и анализ данных литературы о функциях гиалуроновой кислоты в составе синовиальной жидкости, структуре и свойствах молекулы, а также способах её химической модификации. Проводил систематизацию данных о медицинских изделиях и лекарственных препаратах гиалуроновой кислоты для внутрисуставного введения. Е. Ю. Загорюлько занималась определением особенностей состава, технологии и упаковки растворов гиалуроновой кислоты для внутрисуставного введения, а также проводила анализ современных трендов в их разработке.

Для цитирования: Загорюлько Ю. Ю., Загорюлько Е. Ю. Особенности растворов гиалуроновой кислоты для внутрисуставного введения и современные тенденции в их разработке. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020; 9(2): 45–54.

Features of Hyaluronic Acid Solutions for Intra-articular Introduction and Recent Trends in Their Development (Review)

Yury Y. Zagorulko¹, Elena Y. Zagorulko^{2*}

1 – Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 2, Litovskaya str., Saint-Petersburg 194100, Russia

2 – Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Elena Y. Zagorulko. E-mail: elena.zagorulko@pharminnotech.com

Received: 13.02.2020. Accepted: 13.03.2020

Abstract

Introduction. The most common way to maintain the viscoelastic properties of synovial fluid is intra-articular administration of hyaluronic acid solutions. Such forms have several features due to the method of administration, the characteristics of the substance, as well as their composition, technology, and packaging. The aim of the work to analyze the features of hyaluronic acid solutions for intra-articular administration, as well as to consider recent trends to their pharmaceutical development.

Text. Currently, in Russia, most of these forms are registered as medical devices. Each drug has its characteristics, including the source of the substance, the main molecular weight and the molecular weight range of hyaluronic acid, the structure of the molecule (linear or cross-linked), the method of its chemical modification, concentration, solution volume, dosage, etc. As excipients most often use sodium chloride, water for injection, and phosphate-buffered saline to maintain pH values close to the synovial fluid. Some prostheses contain mannitol as an antioxidant. Combinations of

© Загорюлько Ю. Ю., Загорюлько Е. Ю., 2020

© Zagorulko Y. Y., Zagorulko E. Y., 2020

hyaluronic acid with active chondroprotective substances (chondroitin sulfate, sodium succinate) are known. The main type of primary packaging is glass prefilled syringes. The choice of sterilization methods is determined by the chemical structure of hyaluronic acid, aseptic production is used for most prostheses.

Conclusion. Currently, research solutions to create thermostable and enzyme-resistant compositions with hyaluronic acid for intra-articular administration are being successfully applied. Modern developments are aimed at creating polymer complexes of hyaluronic acid with substances that improve the lubricity of solutions, the development of nanosystems (liposomes, nanoparticles, nano micelles, etc.) with chondroprotective, as well as the creation of inert biocompatible prostheses with viscoelastic properties. The creation of forms of hyaluronic acid and alternative drugs that can support the rheological properties of synovial fluid is currently a promising area of research.

Keywords: synovial fluid prosthesis, solution for intra-articular injection, medical device, osteoarthritis, hyaluronic acid, technology, composition, development.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Yury Y. Zagorulko carried out a search and analysis of literature data on the hyaluronic acid functions in synovial fluid, molecules structure, and properties, as well as its chemical modifications methods and systematized of data on medical devices and pharmaceutical preparations of hyaluronic acid for intra-articular administration. Elena Y. Zagorulko determined the composition, technology, and packaging of hyaluronic acid solutions for intra-articular administration characteristics, as well as carried out an analysis of recent trends in their development.

For citation: Zagorulko Y. Y., Zagorulko E. Y. Features of hyaluronic acid solutions for intra-articular introduction and recent trends in their development. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 45–54.

ВВЕДЕНИЕ

В современной травматологии и ортопедии выделяют ряд состояний – дегенеративных, травматических, воспалительных, при которых происходит изменение состава, количества, а также вязкоэластических, трофических, метаболических свойств синовиальной жидкости, что приводит к воспалительным изменениям в суставах (синовит) [1–4].

При этом увеличивается трение между суставными поверхностями, что сопровождается патологическими изменениями в хрящевой ткани и болевыми ощущениями. В комплексе лечения этих состояний одним из этапов является использование протезов синовиальной жидкости, которые представляют собой растворы для внутрисуставного введения, чаще всего содержащие гиалуроновую кислоту (ГК). Это позволяет уменьшить трение, а также улучшить амортизационные, вязкоэластические свойства синовиальной жидкости (*viscosupplementation*) [6–7]. В случае начальных проявлений заболеваний (хондромалиция, остеоартроз) введение ГК может способствовать замедлению развития деструктивных процессов в хрящевой ткани [3, 8].

Роль высокомолекулярной ГК в составе синовиальной жидкости сложна и включает как поддержание её реологических свойств, так и ряд биологических функций: противовоспалительное действие (подавление экспрессии провоспалительных цитокинов – интерлейкинов 1, 6, 8, простагландина E2, фактора некроза опухоли альфа и др.), анальгезирующий эффект (уменьшение ноцицептивных реакций, уровня брадикинина и др.), хондропротекторное действие (угнетение апоптоза хондроцитов и стимуляция их пролиферации), стимуляция синтеза протеогликана и глюкозамина и др. [7, 9–13].

Поэтому внутрисуставно введённая ГК помимо механического поддержания вязкоэластических свойств синовиальной жидкости, защиты суставных поверхностей от трения и купирования боли, может оказывать влияние и на метаболизм хрящевой ткани. При

этом выраженность и длительность основного и сопутствующих эффектов во многом зависят от свойств конкретного препарата и особенностей ГК, входящей в его состав.

Сравнению клинической эффективности и безопасности внутрисуставного введения различных препаратов ГК посвящено большое число исследований [3, 5–7]. В то же время представляет интерес рассмотрение особенностей данных препаратов с точки зрения их разработки. Среди них можно выделить: обусловленные способом введения (особая техника введения, особенности шприцов и игл); особенностями субстанции (источник получения, молекулярная масса, структура молекулы ГК и др.); особенностями состава, технологии и упаковки конкретного препарата; особенностями регистрации (лекарственный препарат или медицинское изделие).

В настоящее время известны разработки, направленные на преодоление недостатков существующих растворов ГК – как успешно используемые, так и находящиеся на стадии исследований [12, 14–18].

Целью работы является анализ особенностей растворов ГК для внутрисуставного введения, а также рассмотрение современных подходов к их фармацевтической разработке.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Гиалуроновая кислота в составе синовиальной жидкости

ГК представляет собой глюкозаминогликан, состоящий из эквимольных количеств N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкуроновой кислоты, связанных β -1,3- и β -1,4-гликозидными связями. Линейные молекулы ГК в растворе свёрнуты в левозакрученные спирали, которые в синовиальной жидкости за счёт меж- и внутримолекулярного взаимодействия формируют пространственную сетку. Такая структура с большим количеством полярных амидных и карбоксильных групп задерживает и связывает воду вследствие фор-

мирования гидратной оболочки, что препятствует адсорбции на поверхности хрящевой ткани белков и клеток [6, 9, 12, 13, 19, 20].

Синовиальная жидкость человека в норме в 1 мл содержит от 1 до 4 мг ГК со средним значением молекулярной массы около 3 млн Да. Более 90 % молекул имеют массу в диапазоне 2,5–7 млн Да [1, 2, 4, 13, 21].

Известны отличия в биологических функциях ГК разных молекулярных масс. Так, комплекс эффектов, оказывающих в сумме хондропротекторное действие, реализует главным образом ГК с массой более 500 тыс. Да [9–11].

Низкомолекулярная ГК (менее 100 тыс. Да) активирует миграцию клеток, а также ускоряет их пролиферацию. В синовиальной жидкости здорового человека её содержание невелико (3–7 %), однако ряд патологических состояний (остеоартроз) сопровождается уменьшением количества и молекулярной массы ГК. Накопление олигомеров ГК может индуцировать воспалительный процесс и ускорить деструкцию хрящевой ткани [2, 4, 22].

Известно, что ГК с молекулярной массой 0,5–4 млн Да, присутствующая в экстрацеллюлярном матриксе, способна усиливать синтез эндогенной ГК синовиальными фибробластами [11]. Это обусловлено размерами специфических мест связывания на мембранах клеток и возможностью взаимодействия с ними гидрофобных участков молекул ГК.

Одна часть высокомолекулярной ГК адсорбирована на поверхности хрящевой ткани, а другая находится в свободном состоянии в виде трёхмерной сетки, выполняющей роль «гидрофильного сита». Адсорбированная ГК выполняет роль смазки при значительных усилиях сдвига, препятствуя соприкосновению суставных поверхностей при движении с нагрузкой. Свободная ГК выполняет смазывающую функцию в состоянии покоя за счет увеличения вязкости синовиальной жидкости [5, 9, 13, 23].

Улучшению смазывающих свойств способствуют гидрофобные взаимодействия ГК с лубрицином – муциноподобным гликопротеином синовиальной жидкости. Их синергизм значительно усиливает скользящие и антиадгезионные свойства поверхности [19, 24].

Катаболизм ГК связан с работой ферментов из классов гиалуронидаз, глюкоксидаз и некоторых других. Известно, что в организме человека за сутки подвергается деполимеризации и вновь образуется около 30 % ГК [25].

Источники получения и химическая модификация молекул гиалуроновой кислоты

Молекулы ГК, как несультатированного гетерополисахарида, не способны к изомерии, и их линейная структура у живых организмов одинакова. В промышленных масштабах её выделяют из сырья животного

происхождения, а также получают методом микробного синтеза [6, 13, 20].

В настоящее время основным сырьём животного происхождения для выделения ГК являются гребни кур. Для субстанции, полученной таким способом, существует опасность наличия следовых количеств белка, которые могут индуцировать аллергические реакции. Так, производитель эндопротеза Синвиск® (Synvisc®, Genzyme Corporation, США) предупреждает, что изделие «может содержать небольшое количество куриного белка» и противопоказано пациентам с гиперчувствительностью [26]. В препарате Гиалган® Фидия используют высокоочищенную ГК из сырья животного происхождения [27].

Большинство известных форм для внутрисуставного введения содержат ГК, полученную методом микробного синтеза (продуценты – бактерии родов *Streptococcus* и *Pasteurella*). Данный способ позволяет получать субстанцию без белковых примесей, однако существует риск её загрязнения бактериальными эндотоксинами [13, 20].

Линейная структура высокомолекулярной ГК чувствительна к внешним условиям: её деполимеризацию могут вызывать нагревание, интенсивное механическое перемешивание, воздействие гамма-облучения, изменение pH среды, наличие в ней свободных радикалов и др. Классические способы выделения и очистки субстанции включают нагревание, гомогенизацию, изменение кислотности среды и обработку органическими растворителями, в результате чего содержащиеся в сырье молекулы массой 9–10 млн Да деполимеризуются до 0,5–2 млн Да [6, 9, 13, 20].

Известны следующие способы получения высокомолекулярной ГК: выбор более мягких условий очистки для сохранения нативной массы молекул, выделение олигомеров и синтез ГК на их основе; создание химически модифицированных соединений с заданной молекулярной массой.

При введении в сустав линейные молекулы ГК включаются в метаболизм, что приводит к их постепенной деполимеризации. Получение устойчивых к действию ферментов молекул ГК проводится путём создания поперечных сшивок между ними [13]. Это позволяет увеличить длительность эффекта при внутрисуставном введении [до 12 месяцев – Синокрон® форте (Synocrom® forte, Croma-Pharma GmbH, Австрия) и др.], а также уменьшить число инъекций [в ряде случаев, до однократного введения – Гируан® I (Hyruan One®, LG Life Sciences, Республика Корея), Ферматрон® С (Fermathron® S, Hyaltech Ltd. Великобритания) и др.] [28–30]. В случае форм для внутрисуставного введения в качестве сшивающих агентов используют формальдегид и дивинилсульфон (двухступенчатая сшивка – Синвиск®), дивинилсульфон (Синокрон® форте), 1,4-(ди-2',3'-эпоксипропилокси)бутан (BDDE) – Гируан® I и др. [13, 26, 28, 30].

Следует учитывать степень очистки субстанции от реагентов и их биосовместимость. Так, примесь фор-

мальдегида и продукты деполимеризации формальдегидных сшивок ГК могут оказывать повреждающее действие на хрящевую ткань. Соединение *BDDE* является нетоксичным и биосовместимым, однако в недавнем исследовании установлено наличие неописанной ранее низкомолекулярной примеси, обнаруженной в геле поперечносшитой *BDDE* ГК после его стерилизации автоклавированием [31]. Поэтому поиск безопасных и нетоксичных сшивающих агентов для ГК остаётся актуальной задачей. Одним из перспективных направлений является создание условий для самосшивки гиалуроновой кислоты без применения химических агентов, которое реализовано в протезе Рипарт® Лонг (ООО «Ингал», Россия) [32].

Таким образом, свойства и длительность действия растворов ГК, наличие побочных эффектов в значительной степени зависят от её химической структуры, источника получения и способов очистки.

Формы гиалуроновой кислоты для внутрисуставного введения

В настоящее время в России зарегистрированы один лекарственный препарат ГК (Гиалган® Фидия, МНН – гиалуровая кислота, Fidia Pharmaceutici S.p.A., Италия) и более 30 медицинских изделий [27, 32] (рисунки 1).

Общая характеристика. Медицинские изделия имеют следующие наименования «эндопротез (протез, имплантат) синовиальной жидкости», «имплантат вязкоупругий стерильный для внутрисуставных инъекций» и др. Каждая форма имеет свои характеристики, в том числе: источник получения субстанции, основная молекулярная масса ГК (от 0,5 до 100 млн Да) и диапазон молекулярных масс, структура молекулы (линейная или поперечносшитая), способ её химической модификации, концентрация ГК (от 0,8 до 2,3 %), объём одной дозы раствора (от 1,0 до 6,0 мл) и др. [6, 26–30, 32–36]. Как следствие, препараты различаются реологическими свойствами, длительностью и выраженностью эффекта, а также имеют особенности в показаниях к применению и режиме дозирования.

Так, формы с низкомолекулярной ГК (Гиалган® Фидия), которая элиминируется из сустава в течение нескольких дней после введения, предназначены в основном для купирования боли в острых случаях остеоартроза [27]. Однократное введение протеза Дьюралан® (Durolane®, Bioventus LLC, США) показано для длительного поддержания вязкости синовиальной жидкости в глубоких случаях деструкции хрящевой ткани.

Молекулярная масса поперечносшитой ГК в составе большинства протезов (кроме линейки Синокром® – Synocrom®, Croma-Pharma GmbH, Австрия) превышает значения, характерные для эндогенной ГК, что ограничивает их назначение поддержанием вязкости, без выполнения метаболических функций [30].

Вязкость растворов ГК зависит от её молекулярной массы, химической модификации и concentra-

ции раствора. Многие модифицированные молекулы имеют большую вязкость растворов, чем их линейные аналоги (Синокром® форте). Как правило, протезы, содержащие молекулы с массой от 3 млн Да или с высоким содержанием ГК имеют гелеобразную консистенцию [32, 37].

Особенности состава. Большинство растворов ГК для внутрисуставного введения имеют схожий состав и в качестве вспомогательных веществ содержат натрия хлорид, воду для инъекций и буферный раствор (чаще всего фосфатный, состоящий из гидро- и дигидрофосфатов натрия) для поддержания значений pH, близких к синовиальной жидкости (7,3–7,6) [26–30, 32–36].

Некоторые протезы (Ostenil® Plus, TRB Chemedica AG, Германия; Hyapro®, ООО «ИНФАРМ», Россия) содержат в качестве стабилизатора и антиоксиданта маннитол. Внутрисуставное введение сопровождается появлением в синовиальной жидкости обломков клеточных структур и образованием свободных радикалов – так называемый «окислительный стресс» [34, 38, 39, 40]. Маннитол эффективно связывает свободные радикалы, защищая молекулы ГК от деполимеризации. Его введение не изменяет реологические свойства растворов ГК [39].

Сочетание с другими активными компонентами. Известны растворы ГК для внутрисуставного введения, содержащие и другие компоненты с хондропротекторным действием. В состав протеза Гиалуром® Хондро (Hialurom® Hondro, S.C. Rompharm Company S.R.L., Румыния) включен 3,0 % раствор хондроитина сульфата [32]. Гиалуаль-АРТРО (Hyalual®-ARTRO, Украина, ООО «Юрия-Фарм») дополнительно содержит сукцинат натрия, который оказывает анаболическое действие, стимулируя образование компонентов синовиальной жидкости, а также нормализует внутриклеточный метаболизм хрящевой ткани [41].

Особенности технологии. Для большинства растворов, содержащих линейные молекулы ГК используют асептическое производство и наполнение (Ферматрон®, Ферматрон® Плюс, Эуфлекс®, Вископлюс® и др.) [29, 32]. Для исключения попадания воздуха в шприц в некоторых случаях применяют индивидуальное наполнение под вакуумом (линейка Рипарт® и др.).

Метод двойной микрофльтрации применяется в технологии линейки протезов Гиapro® [40]. Одним из его недостатков является трудность фильтрации вязких растворов, а также задерживание молекул, размеры которых превышают размер пор [43].

Для защиты молекул ГК от деполимеризации при термической стерилизации используют добавление специальных агентов, химическую модификацию молекул или выбор особых параметров технологического процесса [9, 13, 42, 43]. В исследовании [42] установлено, что растворы ГК (2 млн Да), сшитой дивинилсульфоном, не изменяют своих свойств только стерилизации в режиме 118 °C в течение 5 мин.

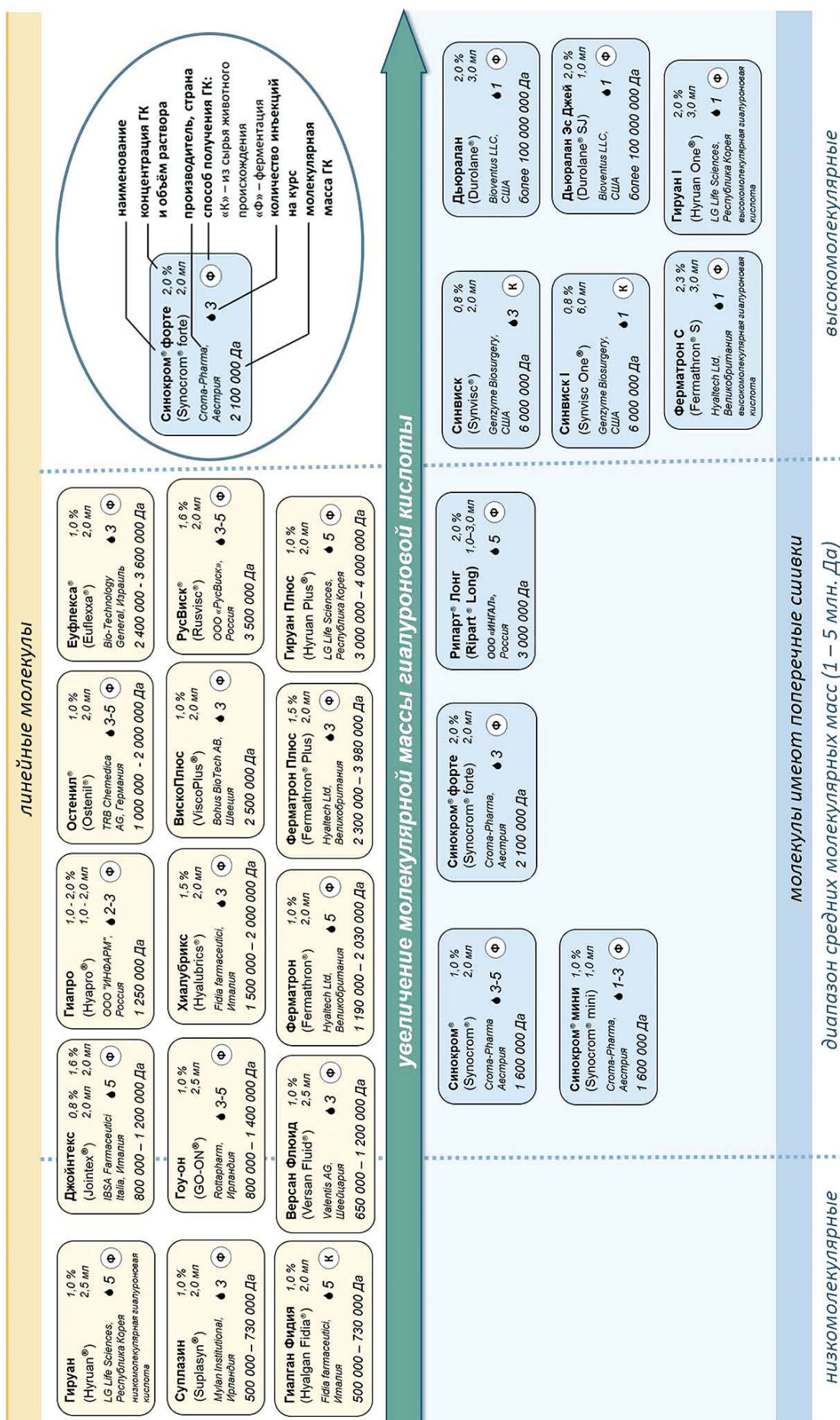


Рисунок 1. Характеристика некоторых форм гиалуроновой кислоты для внутрисуставного введения [6, 26–30, 32–36]
Figure 1. Characterization of some forms of hyaluronic acid for intra-articular administration [6, 26–30, 32–36]

Стерилизация влажным паром в подобранных условиях применяется для протезов, содержащих поперечносшитые молекулы ГК (линейка Синокрон®, протез Ферматрон® С, Рипарт® Лонг) [29, 30], а также для некоторых растворов линейных молекул – протезы РенехаВис™ (RenehaVis™, MDT Int'l SA, Швейцария), Остенил®, Рипарт® [34, 35].

Известно, что маннитол способствует защите молекул ГК от деполимеризации при термическом воздействии. Содержащий его протез Остенил® Плюс стерилизуют автоклавированием [34, 38, 39].

Введение веществ, защищающих ГК от деполимеризации при воздействии гамма-облучения (борной кислоты, пиррогаллола, аскорбата натрия и др.) в настоящее время не нашло своего применения в технологии растворов для внутрисуставного введения [9].

В работе [43] предложена стерилизация субстанции ГК (1,6–2,0 млн Да) оксидом этилена (12 часов при комнатной температуре). Такая обработка незначительно влияла на реологические свойства полученного из неё раствора.

Поскольку техника внутрисуставных, как и любых парентеральных инъекций, требует соблюдения правил асептики, многие производители дополнительно стерилизуют и вторичную упаковку (протез GO-ON®, линейка Остенил®) для обеспечения стерильности внешней поверхности шприца. Стерилизация вторичной упаковки оксидом этилена применяется для протеза ВискоПлюс® (ViscoPlus®, Bohus BioTech AB, Швеция) линейки протезов Ферматрон® [29, 36].

Особенности упаковки. Основным видом первичной упаковки растворов ГК для внутрисуставного введения являются преднаполненные шприцы. Рассчитанные на однократное применение, они, как правило, не имеют градуировки. Наиболее распространённым материалом является стекло (боросиликатное стекло I гидролитического класса) [27, 32], но известна и полимерная упаковки (шприц-тюбик для протеза Вискосил® – Viskoseal®, TRB Chemedica AG, Германия). Многие производители дополняют комплект иглами инъекционными размеров от 18 до 23G [32].

Преднаполненные шприцы помещают в контурную ячейковую упаковку, сконструированную таким образом, чтобы предотвратить давление на шток шприца при транспортировке и хранении (Durolane®, ГиулаьАРТРО®, Вископлюс®, линейки Ферматрон®, Синвиск® Синокрон®, GO-ON®, линейка Гируан® и др.), которую затем упаковывают в пачки картонные [26, 30–33].

Часто первичная и вторичная упаковки характеризуется особенностями конкретных производителей. Так, для протеза РенехаВис™ используют двухкамерный стеклянный шприц. В одном его шприце содержится по 0,7 мл растворов 2,2 % низкомолекулярной (1 млн Да) и 1,0 % высокомолекулярной ГК. Линейные молекулы с большой массой служат для поддержания

вязкости, а с малой – для выполнения физиологических функций ГК [35].

В упаковку протеза Гируан® I включена тонкостенная игла 21G TW, увеличенный просвет которой способствует более быстрому введению раствора, а тонкие стенки – снижению болезненности при инъекции [28].

В линейках многих производителей есть протезы с уменьшенным объёмом (1,0 мл), предназначенные для малых суставов (Дьюралан® Эс Джей, Остенил® Мини, Синокрон® мини, Рипарт® и др.) [30, 33, 34].

Направления разработки форм гиалуроновой кислоты для внутрисуставного введения

Вязкость синовиальной жидкости как неньютоновской системы с псевдопластическим типом течения зависит от напряжения сдвига. Тем же свойством обладают и растворы ГК. При движении суставных поверхностей напряжение сдвига таково, что вязкость синовиальной жидкости уменьшается до значений, близких к чистому растворителю (воде). Защита поверхностей от соприкосновения на этом этапе происходит за счёт ГК, адсорбированной на поверхности хрящевой ткани. После снятия нагрузки вязкость синовиальной жидкости восстанавливается до исходных значений (около 5 Па · с) [21, 37, 44, 45].

Такой механизм обеспечивает свободу движения сустава в норме. При патологических изменениях поверхности хрящевой ткани требуется дополнительная защита и облегчение скольжения. Одним из способов его обеспечения может быть внутрисуставное введение жидкостей, обладающих улучшенными скользящими свойствами и меньшим коэффициентом трения по сравнению с растворами ГК [12, 15].

Известны следующие направления совершенствования составов:

1. *Введение вспомогательных веществ*, модифицирующих реологические свойства растворов ГК. Здесь можно выделить создание композиций с веществами природного и синтетического происхождения, проявляющими химический синергизм с ГК (гидрофобное или электростатическое взаимодействие). Введение лубрицина, оксида графена, фосфолипидов, коллагена, полисахарида семян тамаринда приводило к уменьшению коэффициента трения растворов ГК по сравнению с синовиальной жидкостью [46–48]. В последнем случае состав обладал также и термостабильностью [48].

Известна разработка состава, образующего гель после введения в сустав (*in situ* гель). Композиция включала ГК (0,75–1,0 млн Да), диклофенак калия как противовоспалительное средство и полоксамер 407 как модификатор вязкости, образующий гель при повышении температуры до 37 °C [49].

2. *Создание полимерных комплексов ГК.* Представляет интерес синтез амидированных производных ГК, растворы которых обладают улучшенными скользкими свойствами [14], а также конъюгация ГК с производными фосфатидилхолина [12, 50]. В работе [12] полимерное соединение являлось биосовместимым, а коэффициент трения в его растворах был значительно ниже таковых для растворов высоко- и низкомолекулярной ГК. Уменьшение трения происходило за счет гидратации заряженных групп фосфатидилхолина.

3. *Разработка наносистем ГК и её производных.* В исследовании [51] были созданы наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), содержащие ГК. Использование PLGA как носителя позволило контролировать высвобождение ГК, а возможность введения в состав других ионных соединений – создавать системы, высвобождение ГК из которых будет дополнительно регулироваться значениями pH.

Можно выделить также разработку комбинированного средства для лечения ревматоидного артрита, содержащего соединение ГК с куркумином в виде наномицелл, внутрисуставное введение которых обеспечивало противовоспалительное действие и улучшение скольжения суставных поверхностей за счет их гидрофильной оболочки [15].

Поддержание вязкоэластических свойств синовиальной жидкости: перспективы создания протезов для внутрисуставного введения

Несмотря на то, что внутрисуставное введение ГК является клинически одобренным, в настоящее время продолжают поиски альтернативных составов для поддержки вязкоэластических свойств синовиальной жидкости. Одной из причин этого является возможность накопления (в случае нарушения метаболизма в хрящевой ткани) продуктов биodeградации экзогенной ГК, что может индуцировать воспалительный процесс [2, 4, 7, 22].

Выделяют два направления исследований: создание систем для внутрисуставного введения с хондропротекторами и разработка инертных биосовместимых протезов с вязкоупругими свойствами.

В первом случае внимание направлено на использование носителей для активных субстанций – липосом, микро- и наночастиц из биоразлагаемых материалов, модифицирующих высвобождение действующих веществ и реологические свойства систем [17, 52]. Так, липосомы из производного фосфатидилхолина с включенным в состав D-глюкозамина сульфатом способствовали снижению трения во внутрисуставном пространстве [52].

Вторым направлением является создание протезов на основе природных и синтетических соединений, выполняющих исключительно механические

функции поддержания вязкоэластических свойств синовиальной жидкости. В настоящее время используется протез Нолтрекс™ (Noltrex™, ООО «НЦ «БИО-ФОРМ», Россия), который содержит водный раствор полиакриламидного комплекса и ионы серебра [18].

В исследованиях [16, 48] показана возможность использования в качестве протезов синовиальной жидкости геля поперечносшитой геллановой камеди с привитым поливиниловым спиртом, а также раствора полисахарида семян тамаринда.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растворы ГК для внутрисуставного введения зарегистрированы как медицинские изделия (протезы синовиальной жидкости) и характеризуются следующими особенностями.

Чем больше *молекулярная масса*, тем дольше ГК сохраняется во внутрисуставном пространстве. С этим связана разница в назначении растворов низко- и высокомолекулярной ГК. При этом следует учитывать существование диапазона «физиологических» молекулярных масс (до 4–5 млн Да): молекулы ГК большего размера не связываются с рецепторами клеточных мембран и не могут выполнить ряд метаболических функций нативной ГК. То же относится и к поперечносшитым молекулам ГК, которые, приобретая устойчивость к действию ферментных систем и термическому воздействию, отдаляются от «физиологичности» и их функции, сводятся главным образом к механическому поддержанию вязкости синовиальной жидкости.

Источник получения, способы очистки, наличие химической модификации молекул ГК, вид сшивающего агента влияют на наличие возможных примесей в субстанции. Поэтому разработка способов очистки субстанции ГК, поиск сшивающих агентов и исследование их безопасности в настоящее время остаются актуальными задачами. Приоритетным является использование субстанций высокой степени очистки для исключения возможности попадания примесей во внутрисуставное пространство.

Концентрация ГК находится в пределах 0,8 до 2,3 %. Растворы с высоким содержанием ГК имеют гелеобразную консистенцию. Их введение используется для сокращения числа инъекций на курс, а также в случае тяжелых форм патологии суставов. Состав большинства протезов сходен и ограничен приближением к синовиальной жидкости. Перспективно включение в него стабилизаторов-антиоксидантов, а также создание композиций с другими активными веществами с хондропротекторным действием.

Способ стерилизации растворов зависит от структуры молекулы ГК. Перспективным направлением является создание её термоустойчивых форм. Многие производители уделяют внимание дополнительной стерилизации вторичной упаковки.

Упаковка протезов характеризуется особенностями конкретных производителей, наиболее распространённым вариантом является стеклянные преднаполненные шприцы.

Основным направлением разработки протезов для внутрисуставного введения является создание жидкостей, близких по составу, физико-химическим и реологическим свойствам к синовиальной жидкости, способных выполнять её метаболические функции и обладающих улучшенными амортизационными и скользкими свойствами.

Таким образом, аналитический обзор данных литературы позволил в сравнительном аспекте оценить особенности конкретных форм ГК для внутрисуставного введения, определить основные направления разработки систем, направленных на поддержку вязкоэластических свойств синовиальной жидкости, а также определить, какие факторы следует учитывать при выборе субстанции и фармацевтической разработке форм ГК для внутрисуставного введения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barker S. A., Bayyuk S. H., Brimacombe J. S., Hawkins C. F., Stacey M. Fingerprinting the hyaluronic acid component of normal and pathological synovial fluids. *Clin Chim. Acta.* 1963; 8: 902–909. DOI:10.1016/0009-8981(63)90013-5.
2. Dahl L. B., Dahl I. M., Engstrom-Laurent A., Granath K. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 1985; 44: 817–822. DOI:10.1136/ard.44.12.817.
3. Dernek B., Kesiktaş F. N., Duymus T. M., Diracoglu D., Aksoy C. Therapeutic efficacy of three hyaluronic acid formulations in young and middle-aged patients with early-stage meniscal injuries. *J Phys Ther Sci.* 2017; 29(7): 1148–1153. DOI: 10.1589/jpts.29.1148.
4. Temple-Wong M. M., Ren S., Quach P., Hansen B. C., Chen A. C., Hasegawa A., D'Lima D. D., Kozioł J., Masuda K., Lotz M. K., Sah R. L. Hyaluronan concentration and size distribution in human knee synovial fluid: variations with age and cartilage degeneration. *Arthritis Res Ther.* 2016; 18: 18. DOI: 10.1186/s13075-016-0922-4.
5. de Rezende M. U., de Campos G. C. Viscosupplementation. *Rev Bras Ortop.* 2015; 6;47(2):160-4. DOI: 10.1016/S2255-4971(15)30080-X.
6. Bowman S., Awad M. E., Hamrick M. W., Hunter M., Fulzele S. Recent advances in hyaluronic acid based therapy for osteoarthritis. *Clin Transl Med.* 2018; 7(1): 6. DOI: 10.1186/s40169-017-0180-3.
7. Migliore A., Granate M. Intra-articular use of hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis. *Clinical Interventions in Aging.* 2008; 3(20): 365–369. DOI: 10.2147/cia.s778.
8. Hakakzadeh A., Azarsina S., Biglari F. A New Approach to Treatment of Patellar Chondromalacia Intra-Articular Injection of Hyaluronic Acid. *Trauma Mon.* 2019; 24(4): e88983. DOI: 10.5812/traumamon.88983.
9. Selyanin M. A., Boykov P. Y., Khabarov V. N., Polyak F. Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine. *John Wiley & Sons, Ltd.* 2015: 198. DOI: 10.1002/9781118695920.
10. Sirin D., Kaplan N., Yilmaz I., Karaarslan N., Ozbek H., Akyuva Y. The association between different molecular weights of hyaluronic acid and CHAD, HIF-1 α , COL2A1 expression in chondrocyte cultures. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2018. DOI: 10.3892/etm.2018.5943.
11. Smith M. M., Ghosh P. The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheumatol Int.* 1987; 7: 113–122. DOI: 10.1007/bf00270463.
12. Zheng Y., Yang J., Liang J., Xu X., Cui W., Deng L., Zhang H. Bioinspired Hyaluronic Acid/Phosphorylcholine Polymer with Enhanced Lubrication and Anti-Inflammation. *Biomacromolecules.* 2019; 20(11): 4135–4142. DOI: 10.1021/acs.biomac.9b00964.
13. Сигаева Н. Н., Колесов С. В., Назаров П. В., Вильданова Р. Р. Химическая модификация гиалуроновой кислоты и ее применение в медицине. Вестник Башкирского университета. 2012; 17, 3: 1220–1241.
14. Borzacchiello A., Mayol L., Schiavinato A., Ambrosio, L. Effect of hyaluronic acid amide derivative on equine synovial fluid viscoelasticity. *J. Biomed. Mater. Res.* 2010; 92A: 1162–1170. DOI:10.1002/jbm.a.32455.
15. Fan Z., Li J., Liu J., Jiao H., Liu B. Anti-Inflammation and Joint Lubrication Dual Effects of a Novel Hyaluronic Acid/Curcumin Nanomicelle Improve the Efficacy of Rheumatoid Arthritis Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018; 10(28): 23595–23604. DOI: 10.1021/acsami.8b06236.
16. Leone G., Consumi M., Pepi S., Pardini A., Bonechi C., Tamasi G., Donati A., Lamponi S., Rossi C., Magnani A. Enriched Gellan Gum hydrogel as visco-supplement. *Carbohydr Polym.* 2020; 227: 115347. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115347.
17. Liu A., Wang P., Zhang J., Ye W., Wei Q. Restoration effect and tribological behavior of hyaluronic acid reinforced with graphene oxide in osteoarthritis. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2019; 19 (1): 91–97. DOI: 10.1166/jnn.2019.16443.
18. НОЛТРЕКС™. Available at: <https://www.noltrex.ru/pacientam/o-molekulyarnoj-masse/> (дата обращения 27.01.2020).
19. Ye H., Han M., Huang R., Schmidt T. A., Qi W., He Z. Interactions between Lubricin and Hyaluronic Acid Synergistically Enhance Antiadhesive Properties. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019; 11: 18090–18102. DOI:10.1021/acsami.9b06236.
20. Савоськин О. В., Семенова Е. Ф., Рашевская Е. Ю., Полякова А. А., Грибкова Е. А., Агабаева К. О., Моисеева И. Я. Характеристика различных методов получения гиалуроновой кислоты. *Научное обозрение. Биологические науки.* 2017; 2: 125–135.
21. Tirtaatmadja V., Boger D. V., Fraser J. R. E. The dynamic and steady shear properties of synovial fluid and of the components making up synovial fluid. *Rheol Acta.* 1984; 23: 311–321. DOI: 10.1007/bf01332196.
22. Cowman M. K., Shortt C., Arora S., Fu Y., Villavieja J., Rathore J., Huang X., Rakshit T., Jung G. I., Kirsch T. Role of Hyaluronan in Inflammatory Effects on Human Articular Chondrocytes. *Inflammation.* 2019; 42(5): 1808–1820. DOI: 10.1007/s10753-019-01043-9.
23. Tadmor R., Chen N., Israelachvili J. N. Thin film rheology and lubricity of hyaluronic acid solutions at a normal physiological concentration. *J Biomed Mater Res.* 2002; 61(4): 514–523. DOI: 10.1002/jbm.10215.
24. Zappone B., Ruths M., Greene G. W., Jay G. D., Israelachvili J. N. Adsorption, lubrication, and wear of lubricin on model surfaces: Polymer brush-like behavior of a glycoprotein. *Biophys J.* 2007; 92(5): 1693–1708. DOI:10.1529/biophysj.106.088799.
25. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur. J. Cell Biol.* 2004; 83: 317–325. DOI: 10.1078/0171-9335-00392.
26. Synvisc® (Hylan G-F 20). Available at: <https://www.sanofi.ru/-/media/Project/One-Sanofi-Web/Sites/Europe/Sanofi-RU/Home/healthcare-solutions/internal-illnesses/Synvisc-03Jun2012.pdf?la=ru> (accessed 27.01.2020).
27. Государственный реестр лекарственных средств. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx> (дата обращения 27.01.2020).
28. Hyruan®. Available at: <https://philosmed.com/wp-content/uploads/2018/11/20180717.pdf>. (accessed 10.02.2020).
29. Fermathron® Viscosupplements. Available at: <http://www.mediteck-beontop.it/images/pdf/Biologic/0425-2-EMEAenFermathronFamilyBrochure-DIGITAL.pdf> (accessed 27.01.2020).
30. Synocrom®. Available at: <https://docplayer.ru/34843434-Synocrom-for-2-2-ml-40-mg-stabilizirovannyi-rastvor-gialuronata-natriya.html> (accessed 27.01.2020).
31. Fidalgo López J., Deglesne P.-A., Arroyo R., Sepúlveda L., Ranneva E., Deprez P. Detection of a new reaction by-product in BDDE cross-linked autoclaved hyaluronic acid hydrogels by LC–MS analysis. *Medical Devices: Evidence and Research.* 2018; 11: 367–76. DOI: 10.2147/meder.s166999.

32. Государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий. Available at: <http://www.rozsdraznador.ru/services/misearch>. (дата обращения 27.01.2020).
33. Durolane®. Available at: <https://www.durolane.com/cae/durolanesj/> (accessed 27.01.2020).
34. OSTENIL®. Available at: <http://www.chemedica.mx/files/OSTENILLINEBrochure.pdf> (accessed 27.01.2020).
35. RenehaVisTM. Available at: <https://www.renehavis.com/Instruction-for-use> (accessed 27.01.2020).
36. Hyalual®-ARTRO. Available at: https://www.uf.ua/wp-content/uploads/2017/05/The-outcomes-of-the-experimental-study_Diart-Artro.pdf (accessed 27.01.2020).
37. Viscoplus®. Available at: <https://visco-plus.ru/> (accessed 27.01.2020).
38. Nicholls M., Manjoo A., Shaw P., Niazi F., Rosen J. Rheological Properties of Commercially Available Hyaluronic Acid Products in the United States for the Treatment of Osteoarthritis Knee Pain. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2018; 11. DOI: 10.1177/1179544117751622.
39. Mendoza G., Alvarez A. I., Pulido M. M., Molina A. J., Merino G., Real R., Fernandes P., Prieto J. G. Inhibitory effects of different antioxidants on hyaluronan depolymerization. *Carbohydr Res*. 2007; 342(1): 96–102. DOI: 10.1016/j.carres.2006.10.027.
40. Conrozier T., Mathieu P., Rinaudo M. Mannitol Preserves the Viscoelastic Properties of Hyaluronic Acid in an In Vitro Model of Oxidative Stress. *Rheumatol Ther*. 2014; (1): 45–54. DOI: 10.1007/s40744-014-0001-8.
41. Hyapro. Available at: <http://www.hyapro.ru/> (accessed 27.01.2020).
42. Haridas N., Rosemary M. J. Effect of steam sterilization and biocompatibility studies of hyaluronic acid hydrogel for viscosupplementation. *Polymer Degradation and Stability*. 2019; 163: 220–227. DOI: 10.1016/j.polydegstab.2019.03.019.
43. O'Connell C. D., Onofrillo C., Duchi S., Li X., Zhang Y., Tian P. et al. Evaluation of sterilisation methods for bio-ink components: gelatin, gelatin methacryloyl, hyaluronic acid and hyaluronic acid methacryloyl. *Biofabrication*. 2019; 11(3): 035003. DOI: 10.1088/1758-5090/ab0b7c.
44. Krause W. E., Bellomo E. G., Colby R. H. Rheology of sodium hyaluronate under physiological conditions. *Biomacromolecules*. 2001; 2(1): 65–69. DOI: 10.1021/bm0055798.
45. Haward S. J. Characterization of hyaluronic acid and synovial fluid in stagnation point elongational flow. *Biopolymers*. 2014; 101: 287–305. DOI:10.1002/bip.22357.
46. Das S., Banquy X., Zappone B., Greene G. W., Jay G. D., Israelachvili J. N. Synergistic interactions between grafted hyaluronic acid and lubricin provide enhanced wear protection and lubrication. *Biomacromolecules* 2013; 14 (5): 1669–1677. DOI: 10.1021/bm400327a.
47. Forsey R. W., Fisher J., Thompson J., Stone M. H., Bell C., Ingham E. The effect of hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model. *Biomaterials*. 2006; 27(26), 4581–4590. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.04.018.
48. Yoon W. H., Lee K. H. Rheological properties and efficacy of the formulation of hyaluronic acid with tamarind seed polysaccharide for arthritis. *Biorheology*. 2019; 56(1): 31–38. Doi: 10.3233/BIR-190208.
49. Hanafy A. S., El-Ganainy S. O. Thermoresponsive Hyalomer intra-articular hydrogels improve monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020; 573: 118859. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118859.
50. Zhu L., Seror J., Day A. J., Kampf N., Klein J. Ultra-low friction between boundary layers of hyaluronan-phosphatidylcholine complexes. *Acta Biomaterialia*. 2017; 59: 283–292. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.06.043.
51. Zerrillo L., Que I., Vepris O., Morgado L. N., Chan A., Bierau K., Li Y., Galli F., Bos E., Censi R. pH-responsive poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles containing near-infrared dye for visualization and hyaluronic acid for treatment of osteoarthritis. *J Control Release*. 2019; 309: 265–276. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.07.031.
52. Ji X., Yan Y., Sun T., Zhang Q., Wang Y., Zhang M., Zhang M., Zhao X. Glucosamine sulphate-loaded distearoyl phosphocholine liposomes for osteoarthritis treatment: Combination of sustained drug release and improved lubrication. *Biomaterials Science*. 2019; 7(7): 2716–2728. DOI:10.1039/c9bm00201d.

REFERENCES

1. Barker S. A., Bayyuk S. H., Brimacombe J. S., Hawkins C. F., Stacey M. Fingerprinting the hyaluronic acid component of normal and pathological synovial fluids. *Clin Chim. Acta*. 1963; 8: 902–909. DOI:10.1016/0009-8981(63)90013-5.
2. Dahl L. B., Dahl I. M., Engstrom-Laurent A., Granath K. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1985; 44: 817–822. DOI:10.1136/ard.44.12.817.
3. Dernek B., Kesiktas F. N., Duymus T. M., Diracoglu D., Aksoy C. Therapeutic efficacy of three hyaluronic acid formulations in young and middle-aged patients with early-stage meniscal injuries. *J Phys Ther Sci*. 2017; 29(7): 1148–1153. DOI: 10.1589/jpts.29.1148.
4. Temple-Wong M. M., Ren S., Quach P., Hansen B. C., Chen A. C., Hasegawa A., D'Lima D. D., Koziol J., Masuda K., Lotz M. K., Sah R. L. Hyaluronan concentration and size distribution in human knee synovial fluid: variations with age and cartilage degeneration. *Arthritis Res Ther*. 2016; 18: 18. DOI: 10.1186/s13075-016-0922-4.
5. de Rezende M. U., de Campos G. C. Viscosupplementation. *Rev Bras Ortop*. 2015; 6;47(2):160–4. DOI: 10.1016/S2255-4971(15)30080-X.
6. Bowman S., Awad M. E., Hamrick M. W., Hunter M., Fulzele S. Recent advances in hyaluronic acid based therapy for osteoarthritis. *Clin Transl Med*. 2018; 7(1): 6. DOI: 10.1186/s40169-017-0180-3.
7. Migliore A., Granate M. Intra-articular use of hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis. *Clinical Interventions in Aging*. 2008; 3(20): 365–369. DOI: 10.2147/cia.s778.
8. Hakakzadeh A., Azarsina S., Biglari F. A New Approach to Treatment of Patellar Chondromala Intra-Articular Injection of Hyaluronic Acid. *Trauma Mon*. 2019; 24(4): e88983. DOI: 10.5812/traumamon.88983.
9. Selyanin M. A. Boykov P. Y. Khabarov V. N., Polyak F. Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine. *John Wiley & Sons, Ltd*. 2015: 198. DOI: 10.1002/9781118695920.
10. Sirin D., Kaplan N., Yilmaz I., Karaarslan N., Ozbek H., Akyuva Y. The association between different molecular weights of hyaluronic acid and CHAD, HIF-1α, COL2A1 expression in chondrocyte cultures. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018. DOI: 10.3892/etm.2018.5943.
11. Smith M. M., Ghosh P. The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheumatol Int*. 1987; 7: 113–122. DOI: 10.1007/bf00270463.
12. Zheng Y., Yang J., Liang J., Xu X., Cui W., Deng L. Zhang H. Bioinspired Hyaluronic Acid/Phosphorylcholine Polymer with Enhanced Lubrication and Anti-Inflammation. *Biomacromolecules*. 2019; 20(11): 4135–4142. DOI: 10.1021/acs.biomac.9b00964.
13. Sigaeva N. N., Kolesov S. V., Nazarov P. V., Vildanova R. R. Chemical modification of hyaluronic acid and its application in medicine. *Bulletin of Bashkir University*. 2012; 17, 3: 1220–1241. (in Russ).
14. Borzacchiello A., Mayol L., Schiavinato A., Ambrosio, L. Effect of hyaluronic acid amide derivative on equine synovial fluid viscoelasticity. *J. Biomed. Mater. Res*. 2010; 92A: 1162–1170. DOI:10.1002/jbm.a.32455.
15. Fan Z., Li J., Liu J., Jiao H., Liu B. Anti-Inflammation and Joint Lubrication Dual Effects of a Novel Hyaluronic Acid/Curcumin Nanomicelle Improve the Efficacy of Rheumatoid Arthritis Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018; 10(28): 23595–23604. DOI: 10.1021/acsami.8b06236.
16. Leone G., Consumi M., Pepi S., Pardini A., Bonechi C., Tamasi G., Donati A., Lamponi S., Rossi C., Magnani A. Enriched Gellan Gum hydrogel as visco-supplement. *Carbohydr Polym*. 2020; 227: 115347. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115347.
17. Liu A., Wang P., Zhang J., Ye W., Wei Q. Restoration effect and tribological behavior of hyaluronic acid reinforced with graphene oxide in osteoarthritis. *J. Nanosci. Nanotechno*. 2019; 19 (1): 91–97. DOI: 10.1166/jnn.2019.16443.
18. NOLTREX™. Available from: <https://www.noltrex.ru/pacientam/o-molekulyarno-j-masse/> (accessed 27.01.2020) (in Russ).

19. Ye H., Han M., Huang R., Schmidt T.A., Qi W., He Z. Interactions between Lubricin and Hyaluronic Acid Synergistically Enhance Antiadhesive Properties. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019; 11: 18090–18102. DOI:10.1021/acsami.9b18102.
20. Savoskin O. V., Semyonova E. F., Rashevskaya E. Y., Polyakova A. A., Grybkova E. A., Agabalaeva K. O., Moiseeva I. Ya. A description of different methods used to obtain hyaluronic acid. *Scientific Review. Biological science*. 2017; 2: 125–135 (in Russ).
21. Tirtaatmadja V., Boger D. V., Fraser J. R. E. The dynamic and steady shear properties of synovial fluid and of the components making up synovial fluid. *Rheol Acta*. 1984; 23: 311–321. DOI: 10.1007/bf01332196.
22. Cowman M. K., Shortt C., Arora S., Fu Y., Villavieja J., Rathore J., Huang X., Rakshit T., Jung G. I., Kirsch T. Role of Hyaluronan in Inflammatory Effects on Human Articular Chondrocytes. *Inflammation*. 2019; 42(5): 1808–1820. DOI: 10.1007/s10753-019-01043-9.
23. Tadmor R., Chen N., Israelachvili J. N. Thin film rheology and lubricity of hyaluronic acid solutions at a normal physiological concentration. *J Biomed Mater Res*. 2002; 61(4): 514–523. DOI: 10.1002/jbm.10215.
24. Zappone B., Ruths M., Greene G. W., Jay G. D., Israelachvili J. N. Adsorption, lubrication, and wear of lubricin on model surfaces: Polymer brush-like behavior of a glycoprotein. *Biophys J*. 2007; 92(5): 1693–1708. DOI:10.1529/biophysj.106.088799.
25. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur. J. Cell Biol*. 2004; 83: 317–325. DOI: 10.1078/0171-9335-00392.
26. Synvisc® (Hylan G-F 20). Available at: <https://www.sanofi.ru/-/media/Project/One-Sanofi-Web/Websites/Europe/Sanofi-RU/Home/healthcare-solutions/internal-illnesses/Synvisc-03Jun2012.pdf?la=ru> (accessed 27.01.2020).
27. The state register of medicines. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx> (accessed 27.01.2020) (in Russ).
28. Hyruan®. Available at: <https://philosmed.com/wp-content/uploads/2018/11/20180717.pdf>. (accessed 10.02.2020).
29. Fermathron® Viscosupplements. Available at: <http://www.mediteck-beontop.it/images/pdf/Biologic/0425.2-EMEAenFermathronFamilyBrochure-DIGITAL.pdf> (accessed 27.01.2020).
30. Synocrom®. Available at: <https://docplayer.ru/34843434-Synocrom-for-2-2-ml-40-mg-stabilizirovannyi-rastvor-gialuronata-natriya.html> (accessed 27.01.2020).
31. Fidalgo López J., Deglesne P.-A., Arroyo R., Sepúlveda L., Ranneva E., Deprez P. Detection of a new reaction by-product in BDDE cross-linked autoclaved hyaluronic acid hydrogels by LC&MS analysis. *Medical Devices: Evidence and Research*. 2018; 11: 367–76. DOI: 10.2147/meder.s166999.
32. The state register of medical devices and organizations engaged in the production and manufacture of medical devices. Available at: <http://www.roszdravnadzor.ru/services/misearch>. (accessed 27.01.2020) (in Russ).
33. Durolane®. Available at: <https://www.durolane.com/cae/durolanesj/> (accessed 27.01.2020).
34. OSTENIL®. Available at: <http://www.chemedica.mx/files/OSTENILLINEBrochure.pdf> (accessed 27.01.2020).
35. RenehaVisTM. Available at: <https://www.renehavis.com/Instruction-for-use> (accessed 27.01.2020).
36. Hyalual®-ARTRO. Available at: https://www.uf.ua/wp-content/uploads/2017/05/The-outcomes-of-the-experimental-study_Diart-Artro.pdf (accessed 27.01.2020).
37. Viscoplus®. Available at: <https://visco-plus.ru/> (accessed 27.01.2020).
38. Nicholls M., Manjoo A., Shaw P., Niazi F., Rosen J. Rheological Properties of Commercially Available Hyaluronic Acid Products in the United States for the Treatment of Osteoarthritis Knee Pain. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2018; 11. DOI: 10.1177/1179544117751622.
39. Mendoza G., Alvarez A. I., Pulido M. M., Molina A. J., Merino G., Real R., Fernandes P., Prieto J. G. Inhibitory effects of different antioxidants on hyaluronan depolymerization. *Carbohydr Res*. 2007; 342(1): 96–102. DOI: 10.1016/j.carres.2006.10.027.
40. Conrozier T., Mathieu P., Rinaudo M. Mannitol Preserves the Viscoelastic Properties of Hyaluronic Acid in an In Vitro Model of Oxidative Stress. *Rheumatol Ther*. 2014; (1): 45–54. DOI: 10.1007/s40744-014-0001-8.
41. Hyapro. Available at: <http://www.hyapro.ru/> (accessed 27.01.2020).
42. Haridas N., Rosemary M. J. Effect of steam sterilization and biocompatibility studies of hyaluronic acid hydrogel for viscosupplementation. *Polymer Degradation and Stability*. 2019; 163: 220–227. DOI: 10.1016/j.polymdgradstab.2019.03.019.
43. O'Connell C. D., Onofrillo C., Duchi S., Li X., Zhang Y., Tian P. et al. Evaluation of sterilisation methods for bio-ink components: gelatin, gelatin methacryloyl, hyaluronic acid and hyaluronic acid methacryloyl. *Biofabrication*. 2019; 11(3): 035003. DOI: 10.1088/1758-5090/ab0b7c.
44. Krause W. E., Bellomo E. G., Colby R. H. Rheology of sodium hyaluronate under physiological conditions. *Biomacromolecules*. 2001; 2(1): 65–69. DOI: 10.1021/bm0055798.
45. Haward S. J. Characterization of hyaluronic acid and synovial fluid in stagnation point elongational flow. *Biopolymers*. 2014; 101: 287–305. DOI:10.1002/bip.22357.
46. Das S., Banquy X., Zappone B., Greene G. W., Jay G. D., Israelachvili J. N. Synergistic interactions between grafted hyaluronic acid and lubricin provide enhanced wear protection and lubrication. *Biomacromolecules*. 2013; 14 (5): 1669–1677. DOI: 10.1021/bm400327a.
47. Forsey R. W., Fisher J., Thompson J., Stone M. H., Bell C., Ingham E. The effect of hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model. *Biomaterials*. 2006; 27(26), 4581–4590. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.04.018.
48. Yoon W. H., Lee K. H. Rheological properties and efficacy of the formulation of hyaluronic acid with tamarind seed polysaccharide for arthritis. *Biorheology*. 2019; 56(1): 31–38. DOI: 10.3233/BIR-190208.
49. Hanafy A. S., El-Ganainy S. O. Thermoresponsive Hyalomer intra-articular hydrogels improve monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020; 573: 118859. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118859.
50. Zhu L., Seror J., Day A. J., Kampf N., Klein J. Ultra-low friction between boundary layers of hyaluronan-phosphatidylcholine complexes. *Acta Biomaterialia*. 2017; 59: 283–292. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.06.043.
51. Zerrillo L., Que I., Vepris O., Morgado L. N., Chan A., Bierau K., Li Y., Galli F., Bos E., Censi R. pH-responsive poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles containing near-infrared dye for visualization and hyaluronic acid for treatment of osteoarthritis. *J Control Release*. 2019; 309: 265–276. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.07.031.
52. Ji X., Yan Y., Sun T., Zhang Q., Wang Y., Zhang M., Zhang M., Zhao X. Glucosamine sulphate-loaded distearyl phosphocholine liposomes for osteoarthritis treatment: Combination of sustained drug release and improved lubrication. *Biomaterials Science*. 2019; 7(7): 2716–2728. DOI:10.1039/c9bm00201d.



АНАЛИТИКА ЭКСПО



a Hyve event

18-я Международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

22–25.09.2020

Москва, МВЦ «Крокус Экспо»



analitikaexpo.com



Для бесплатного прохода
на выставку зарегистрируйтесь
на сайте указав промокод:

pharmjournal

Современные технологии модифицированного высвобождения биологически активных веществ в фармацевтической разработке (обзор)

Е. И. Савельева^{1*}

¹ – ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России), 188663, Россия, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмолоский, ст. Капитолово, корп. № 93

*Контактное лицо: Савельева Елена Игоревна. E-mail: esavelieva59@mail.ru

Статья получена: 09.01.2020. Статья принята к печати: 24.03.2020

Резюме

Введение. В обзоре представлены различные системы, используемые в качестве матриц включения или модификаторов биологически активных веществ для усиления их абсорбции, либо депонирования и последующего высвобождения как равномерного, так и «по требованию» – в ответ на воздействие стимула.

Текст. В наибольшей степени разработаны технологии включения активных молекул в наноагрегаты циклодекстринов. На этой основе разработаны модифицированные формы гидрокортизона, глибенкламида, ряда пептидных препаратов. Ацетилцистеин, иммобилизованный на частицах этилцеллюлозы или других полимеров, значительно повышает биодоступность пептидных препаратов при их интраназальном введении. Депонирование активных веществ в организме осуществляется за счет их отсроченного контролируемого растворения, адсорбции, капсулирования или этерификации. Высвобождение депонированных веществ при воздействии эндогенного (изменение pH, температуры) или внешнего (воздействие ультразвука, электрического или магнитного поля, химических активаторов) стимула может быть однократным или многократным в зависимости от способности депонирующей системы к самоагрегации.

Заключение. Самоагрегированные пептиды наиболее перспективны для стимул-ориентированного высвобождения/доставки биологически активных веществ. Современные технологии модификации активных веществ повышают эффективность неинвазивных способов их введения, способствуют достижению целевых по локации и времени реализации биологических эффектов.

Ключевые слова: биологически активные вещества, модифицированные формы, наноагрегаты, стимул-ориентированное высвобождение, депо.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Автор участвовал в сборе информации, её анализе и в написании текста статьи.

Для цитирования: Савельева Е. И. Современные технологии модифицированного высвобождения биологически активных веществ в фармацевтической разработке. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020; 9(2): 56–66.

Modern Technologies of Controlled Release of Biologically Active Substances in Pharmaceutical Research and Development (Review)

Elena I. Savelieva^{1*}

¹ – Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology Federal State Unitary Enterprise, Federal Medical Biological Agency, build. 93, Kapitolo station, g/p Kuz'molovsky, Vsevolzskiy district, Leningrad Region, 188663, Russia

*Corresponding author: Elena I. Savelieva. E-mail: esavelieva59@mail.ru

Received: 09.01.2020. Accepted: 24.03.2020

Abstract

Introduction. The review describes various systems used as inclusion matrices or modifiers of biologically active substances to enhance their absorption or deposition and subsequent release, both continuous or «on demand», i.e. in response to a stimulus.

Text. Technologies for the incorporation of active substances into cyclodextrin nanoaggregates are developed to the greatest extent. Such technologies were used to obtain modified forms of hydrocortisone, glibenclamide, and a number of peptide drugs. Acetylcysteine immobilized on ethyl cellulose or other polymer particles significantly increases the bioavailability of peptide drugs on their intranasal administration.

The deposition of active substances in the body takes place by way of their delayed controlled dissolution, adsorption, encapsulation, or esterification. The release of deposited substances upon exposure to an endogenous (change in pH, temperature) or external (exposure to ultrasound, electric or magnetic field, chemical activators) stimulus can be single or multiple, depending on the ability of the accommodating matrix for self-aggregation.

Conclusion. Self-aggregated peptides are most promising for stimulus-induced release/delivery of biologically active substances. Modern technologies for the modification of active substances increase the efficiency of their administration and favor targeted location and implementation time of biological effects.

Keywords: biologically active substances, modified forms, nanoaggregates, stimulus-induced release, depot.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. The author participated in the collection of information, its analysis and in writing the text of the article.

For citation: Savelieva E. I. Modern technologies of controlled release of biologically active substances in pharmaceutical research and development. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 56–66.

ВВЕДЕНИЕ

Модификации препаратов с хорошо известными целевыми и побочными эффектами имеют значительно более короткий путь к практическому применению в сравнении с новыми молекулами. Данная сфера фармацевтической разработки аккумулирует последние достижения физической химии и материаловедения. Соответствующие публикации зачастую оказываются вне сферы внимания фармацевтического сообщества. В то же время результаты исследований фармакокинетики и целевой эффективности модифицированных биологически активных веществ (БАВ) представлены преимущественно в биомедицинских изданиях. В итоге можно говорить о разночтениях у разных когорт специалистов не только в терминологии, но и в трактовке свойств разрабатываемых модифицированных форм БАВ, а также и в оценке перспектив их применения.

Разработка модифицированных форм БАВ позволяет радикально изменить их физико-химические свойства, а вследствие этого поведение в процессах диффузии, осмоса, адгезии, проникновения через мембраны и депонирования в тканях. Как правило, желательна не только более полная, но и более быстрая абсорбция БАВ, однако иногда приоритетной становится задача их пролонгированного или отсроченного высвобождения. Для некоторых фармацевтических эффектов требуется расширение ареала распределения БАВ в организме, но чаще предпочтительной является их целевая доставка в определенные органы/ткани/клетки.

В качестве модифицирующих матриц широко представлены различные виды синтетических полимеров, лигнин, глины (каолин), нановолокна, наноспреи, наноспонжи, полимерные пленки, хитозан и его производные, агрегированные полипептиды (пепсомы) и много другое [1]. В обзоре [2] приводятся сведения о применении твердых дисперсий для оптимизации биофармацевтических свойств нестероидных противовоспалительных средств. При введении этих лекарственных веществ в твердые дисперсии существенно повышается их растворимость. При изготовлении твердых дисперсий обычно используют полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин.

Сравнительные исследования фармакокинетики нативных и модифицированных форм лекарственных средств убедительно доказывают, что модифицированные формы иногда отличаются от нативных не только скоростью абсорбции и временем существова-

ния в системном кровотоке, но и характером распределения в органах и тканях. Так, в работе [3] показано, что включение рифабутин в сополимер молочной и гликолевой кислот значительно влияет на его распределение по органам и тканям. Авторами было установлено повышенное накопление нанокомпозиции рифабутина в тканях легких, печени и селезенки.

Рецептуры на основе наночастиц циклодекстринов

Не только перспективными, но и уже широко апробированными модификаторами БАВ являются наночастицы циклодекстринов. Промышленное производство и выход на рынок комплексов ЦД с БАВ начаты с 80 гг. XX века. Первым продуктом был простагландин E2, включенный в бета-циклодекстрин. Препарат разработали и начали выпускать в форме таблеток в Японии. В настоящее время таких лекарств уже выпускается достаточно много [4]. *Циклодекстрины (ЦД)* – макроциклические олигомеры глюкозы, получаемые ферментативным путём из крахмала. В составе циклодекстринов остатки D-(+)-глюкопиранозы объединены в макроциклы α -D-1,4-гликозидными связями. По свойствам ЦД резко отличаются от обычных (линейных) декстринов. Иногда ЦД называют циклоамилозами, цикломальтоолигосахаридами, цикломальтодекстринами [5]. Благодаря своим свойствам, ЦД широко применяются в пищевых технологиях, фармацевтике, косметике, биотехнологии, аналитической химии, имеют хорошие перспективы использования в текстильной промышленности, в процессах очистки воды и даже в добыче нефти.

Бета-циклодекстрин зарегистрирован и разрешен к применению в качестве пищевой добавки E459. Бета-циклодекстрин – официальное название пищевой добавки, закрепленное в ГОСТ 33782–2016 (в регламенте Таможенного союза используется написание «бета-циклодекстрин», соответствующее международному названию «beta-cyclodextrin», в патентной литературе преобладает сокращение « β -ЦД»). В настоящее время ЦД доступны по ценам, их мировое производство оценивается в объемах десятков тысяч тонн. Известны различные способы применения бета-циклодекстрина в фармацевтической разработке [6]. Широко востребована способность ЦД увеличивать растворимость малорастворимых веществ в воде, а также усиливать проникновение веществ через биологические мембраны [7]. Важно отметить, что

и сам бета-циклодекстрин обладает ценными биологическими свойствами. В частности, эффективен при лечении ожирения [8].

В последние годы появилось множество работ по изучению свойств наносистем, представляющих собой тем или иным способом агрегированные частицы ЦД, включающих БАВ. Основные функции наносистем на основе ЦД – повышение растворимости, стабильности, обеспечение целевой доставки БАВ. Авторам [9] удалось продемонстрировать, как именно происходит агрегация инклюзивных комплексов ЦД, содержащих гидрокортизон. В насыщенном растворе гидрокортизона происходило образование микроагрегатов альфа- и бета-ЦД, при этом была подтверждена метастабильность микроагрегатов, показано, что с повышением температуры и при добавлении этанола происходит уменьшение их размеров. Отметим, что стабильность инклюзивных комплексов ЦД напрямую связывают с жесткостью их структуры. Наиболее стабильными и при этом наименее гибкими являются кристаллические формы наноагрегатов [10]. В работах [11, 12] исследовано повышение растворимости глиценкламида при добавлении высоких концентраций различных ЦД. При этом происходило образование наноагрегатов инклюзивных комплексов (ЦД – глиценкламид) с размером наноагрегатов от 100 до 300 нм. Включение глиценкламида в бета-циклодекстрин происходило через циклогексильное кольцо с образованием целой сети водородных связей. При этом растворимость глиценкламида повышалась в 150 раз. Наночастицы на основе ЦД проявляют совершенно иную скорость высвобождения, способность проникать через биомембраны и прикрепляться к ним, поступать в системный кровоток, транспортироваться клеточными мембранами и т. д. в сравнении с БАВ в молекулярной форме [13]. В итоге можно говорить о значительно более редких приемах БАВ и повышении биодоступности гидрофобных БАВ, в том числе и в сублингвальных формах [14]. В условиях *ex vivo* и *in vivo* исследован механизм чрезкожной абсорбции противовоспалительных средств в виде комплексов с ЦД [15]. Поскольку ЦД имеют гидрофильную поверхность макроциклов и гидрофобные полости внутри структуры, они способны образовывать комплексы с гидрофильными пептидами. В работе [16] описано приготовление комплекса бета-циклодекстрина, включающего многофункциональный короткий пептид АВР-СМ4, имеющий катионные свойства. При проверке его антимикробной активности оказалось, что в составе комплекса она не снижалась. Природный пептид АВР-СМ4 в виде макроциклического комплекса с ЦД рассматривали как перспективный консервант для пищевых продуктов. Комплекс готовили методом сублимационной сушки. Смешивали по 10 мМ бета-циклодекстрина и пептида и перемешивали 14 ч с помощью магнитной мешалки при температуре 40 °С. Затем суспензию фильтровали, вымораживали и лиофилизировали. На данный момент наибольшим потенциалом для

коммерциализации обладают технологии приготовления гелей, содержащих наночастицы разрешенного к применению в косметике и пищевой промышленности бета-циклодекстрина, включающего короткие пептиды. Предпочтительными являются короткие (до 400 Да) биогенные пептиды, разрешенные к применению в косметической и фармацевтической отраслях. В качестве недостатков инклюзивных комплексов БАВ с ЦД в обзоре [17] отмечены ограничения по введению высокой дозы БАВ, а также нефротоксичность кристаллических ЦД. Путь преодоления перечисленных проблем – повышение растворимости инклюзивных комплексов.

Модифицированное высвобождение БАВ при интраназальном введении

Для БАВ белковой и пептидной природы интраназальный путь введения уже давно применяется в качестве неинвазивной альтернативы инъекциям [18, 19]. В обзоре [20] рассмотрены различные средства усиления степени и скорости абсорбции препаратов при их интраназальном введении, в частности применение микро- и наноносителей. При интраназальном введении для облегчения проникновения БАВ через слизистую оболочку применяют усилители¹ абсорбции. В качестве усилителей абсорбции опробованы различные соединения [21, 22], преимущественно представленные биосовместимыми полимерами [23]. В усилении абсорбции при интраназальном введении нуждаются высокомолекулярные БАВ. В работе [19] представлена технология получения инклюзивных комплексов, организованных в виде частиц размером 2,6–2,8 мкм, для интраназального введения инсулина. Из низкомолекулярных соединений в роли усилителя интраназальной абсорбции хорошо зарекомендовал себя N-ацетилцистеин. В качестве модельного БАВ в работе [24] исследовали кальцитонин из лосося. Кальцитонин – пептидный гормон, с молекулярной массой 3,5 кДа, состоит из 32-х аминокислот и секретируется парафолликулярными, или С-клетками, щитовидной железы. При исследовании интраназальной абсорбции кальцитонина у крыс применяли различные порошки в качестве филлеров (носителей). Ранее полагали [25], что филлеры могут быть эффективными для улучшения всасывания низкомолекулярных лекарств, но не оказывают влияния на всасывание высокомолекулярных пептидов. Позднее была показана эффективность филлеров и для усиления абсорбции высокомолекулярных БАВ, в частности, на примере усиления абсорбции кальцитонина. В качестве филлеров были опробованы гидрогенизированное касторовое масло, карбонат кальция, кристаллическая целлюлоза и этилцеллюлоза. При этом наилучшим филлером оказалась этилцеллюлоза, применение которой в качестве филлера позволило получить максимальную абсорб-

¹ Буквальный перевод «энхансеры» здесь неприменим, поскольку в русскоязычных изданиях энхансер имеет более конкретное толкование – стимулирующий транскрипцию участок ДНК.

цию человеческого паратиреоидного гормона и инсулина – $28,2 \pm 6,5 \%$ и $23,4 \pm 10,6 \%$, соответственно. Оптимальной оказалась рецептура следующего состава: 0,1 мг кальцитонина; 0,15 мг ацетилцистеина и 2,75 мг этилцеллюлозы. В работе [26] было показано, что повышение проницаемости слизистой оболочки носа при использовании филлеров в сочетании с ацетилцистеином не связано с микроповреждениями ткани, поскольку отсутствие таких повреждений было доказано при последовательном интраназальном введении препаратов в течение 8 дней. Механизм повышения биодоступности БАВ пептидной природы при их интраназальном введении с помощью усилителя абсорбции, представляющего собой ацетилцистеин, иммобилизованный на частицах этилцеллюлозы, заключается в том, что достигается повышенная концентрация БАВ именно в сайтах абсорбции. Сначала происходит адгезия ацетилцистеина и БАВ на микрочастицах этилцеллюлозы. Затем частицы попадают в микрополости слизистой оболочки, где ацетилцистеин растворяется в ее секрете и понижает вязкость секрета за счет разрыва дисульфидных мостиков в протеинах [27]. В менее вязком назальном секрете БАВ быстрее растворяется, его диффузия через эпителиальную мембрану усиливается. При этом потери за счет протеолиза пептидных и белковых БАВ могут снижаться, так как активные центры ферментов будут насыщаться быстрее. Известно, что в кислой среде эффективность протеолиза пептидов снижается [28], а ацетилцистеин как раз снижает pH среды. Таким образом, было доказано, что *ацетилцистеин* – распространенное муколитическое средство, в смеси с гранулами этилцеллюлозы способствует увеличению абсорбции БАВ пептидной и белковой природы через слизистые оболочки. Использование этилцеллюлозы в качестве загустителя жидких форм или для изготовления микрокапсул лекарственных средств для перорального или интраназального применения является сложившейся практикой. Сведений о кинетике выведения этилцеллюлозы из микрополостей слизистых оболочек в доступной литературе обнаружить не удалось. В то же время не сообщается о каких-либо отрицательных эффектах, связанных с накоплением этилцеллюлозы в слизистых оболочках. В одном из недавних исследований [29] было показано, что способность филлеров к поглощению влаги снижает мукоадгезию БАВ. Возможно, именно этим обстоятельством можно объяснить предпочтительность в качестве филлера этилцеллюлозы, не способной сорбировать воду, в сравнении, например, с кристаллической целлюлозой, такой способностью обладающей.

Стимул-ориентированные высвобождение/доставка БАВ

Модификация высвобождения/доставки БАВ ставит целью обеспечение действия БАВ в нужном месте в нужный момент времени. Мицеллы, наногели, гидрогели, наноконтейнеры и другие материалы для контролируемых высвобождения/доставки БАВ часто

разрабатываются на основе полипептидов [30]. Синтетические полипептиды – модификаторы БАВ, должны быть биосовместимыми, биоразлагаемыми и иметь активные сайты, имитирующие рецепторы природных белков. Полипептиды-модификаторы чаще всего синтезируют путем полимеризации N-карбоксияльдегидов альфа-аминокислот, иницируемой аминами [31].

Стимул-ориентированные средства высвобождения/доставки подразделяются в зависимости от характера стимула и преобразований в структуре носителя, которые происходят при воздействии стимула. Биоматериалы пептидной природы, используемые для стимул-ориентированных высвобождения/доставки БАВ, наиболее полно представлены в обзоре [32]. Полипептиды разнообразны по физико-химическим свойствам, биосовместимости и способности к структурным/конформационным изменениям под действием стимулов. В качестве стимула могут выступать свет, повышение или понижение температуры, pH, ионной силы, действие ферментов.

Из всех многочисленных аспектов применения этой технологии остановимся на контролируемом высвобождении БАВ из полипептидных структур. Пептиды характеризуются структурным и функциональным разнообразием, способны к самоагрегированию и, что особенно важно, они хорошо распознаются биологическими сигнальными системами. Даже незначительные воздействия приводят к конформационным изменениям определенных пептидов, что позволяет выстроить цепочку стимул – ответ [33]. Особенно перспективны с этих позиций пептиды и полипептиды с концевыми группами/связями, способными претерпевать превращения при воздействии стимулов. Для практического применения наиболее перспективными представляются (поли)пептиды, чувствительные к изменению pH и/или температуры.

Чувствительность полипептидов к изменению pH основана на их способности к протонированию/депротонированию [34]. Примерами pH-чувствительных полипептидов являются полимеризованные лизин и глутаминовая кислота [35, 36], которые способны к самоструктурированию с образованием «пептидных щеток». Пептидные щетки представляют собой линейные или разветвленные цепочки, которые связаны с поверхностью концевыми группами. Такая модификация поверхности наночастиц приводит к появлению на ней щетки из пришитых молекул.

Известно, что ткани раковой опухоли имеют повышенную кислотность ввиду накопления в них молочной кислоты и снижения скорости окислительного фосфорилирования. На этой их особенности может быть основана система доставки лекарственных средств в раковую опухоль с помощью pH-чувствительных пептидов [32]. Пептиды на основе полигистидина, в частности, сополимеры полигистидина и полиэтиленгликоля биосовместимы и биоразлагаемы. В то же время, высокая pH-чувствительность полигистидина является не только преимуществом,

но и создает ограничения в его применении ввиду недостаточной стабильности [37, 38]. Гибридные pH-чувствительные агрегаты пептидов (пепсомы) на основе асимметричных 3-х блочных пептидных сополимеров были успешно применены для доставки доксорубина в форме гидрохлорида в ткань опухоли [39]. Пепсомы, которые по существу являлись наночастицами (60–90 нм) имели гидрофильное ядро из полимера на основе глутаминовой кислоты. В этом ядре эффективно удерживался гидрохлорид доксорубина, а при pH 5 и температуре 37 °C осуществлялась его целевая доставка в раковые клетки. Пепсомы были стабильны при pH 7, но при pH 5, имитирующем лизосомальные или эндосомальные условия, гибридные пепсомы утрачивали стабильность, и происходило активное высвобождение гидрохлорида доксорубина. Причиной разрушения пепсом являлось частичное протонирование полиглутаминовой кислоты.

Гибридные (химерные) пепсомы, сконструированные на основе сополимера полилизина, полиглутаминовой кислоты и полиэтиленгликоля, имеют очень хорошую перспективу применения для целевой доставки и других цитостатиков в раковые клетки. С другой стороны, «закисление» тканей, в первую очередь, за счет накопления молочной кислоты, происходит также под действием экстремальных физических нагрузок и может быть стимулом для высвобождения средств фармакологической поддержки из состава пепсом при разработке препаратов для повышения толерантности к физическим нагрузкам.

Как и изменение pH, изменение температуры также может быть стимулом, инициирующим конформационные изменения полипептида-носителя. На этом основаны термо-стимулируемые высвобождение и целевая доставка БАВ. В качестве термочувствительных в работе [40] описаны ковалентные связи между ответвлениями¹ олиго(этиленгликоля) и поли(лизин). Полимер агрегирован в виде спирали. Температурный фактор оказывает обратимое воздействие на конфигурацию спирали.

В работе [41] было показано, что однодоменные пептиды могут быть организованы в поливалентные мицеллы путем их включения в термочувствительные эластиноподобные пептиды (ELPs). Гидрофобные и гидрофильные домены этих пептидов способствуют их обратимой агрегации в мицеллы. Процесс агрегации находится под влиянием температурного фактора. Макроскопическая форма полипептидов меняется под действием температуры обратимо. Температурный фактор (стимул) может быть как внешним, так и внутренним. Как природные, так и синтетические термочувствительные полипептиды могут быть морфологически чрезвычайно разнообразны и представлены

волокнами гидрогелей, мицеллами, в том числе и поперечно сшитыми, сетчатыми полимерами и т. д. [42].

Технологии стимул-ориентированного высвобождения БАВ предполагают формирование депо, в котором БАВ будет находиться до воздействия стимула.

Депо для парентерального введения БАВ

Технологии обеспечения отсроченного/продолжительного высвобождения БАВ из депо суммированы в работе [43].

В основе механизма формирования депо лежат 4 процесса:

- отсроченное контролируемое растворение;
- адсорбция;
- капсулирование;
- этерификация.

В случае отсроченного растворения лимитирующей стадией может быть растворение БАВ как в лекарственной форме, так и в биологической жидкости, контактирующей с лекарственной формой. Примером могут служить труднорастворимые формы налоксона и бупринона [44] или макрокристаллы эфиров тестостерона для внутримышечного введения [45].

Адсорбционный принцип применяется при иммобилизации вакцин на частичках гидроксида алюминия в целях обеспечения длительного присутствия антигена в кровотоке и, соответственно, временного периода, достаточного для формирования необходимого количества антител [46].

Для капсулирования БАВ обычно используются биосовместимые и биоразлагаемые материалы: желатин, декстран, фосфолипиды, длинноцепочечные жирные кислоты. Микрокапсулы изготавливаются в соответствии с желаемым эффектом: повышенной или пониженной способностью проникать через определенные мембраны, прикрепляться к мембранам, диффундировать в потоках биожидкостей, проникать в ткани и задерживаться в них [47].

Техника этерификации нашла широкое применение в разработке антипсихотических лекарств длительного действия. Лекарственное средство в этих случаях применяется в виде эфира длинноцепочечной жирной кислоты и вводится парентерально в виде масляного раствора. Образуются внутримышечные масляные депо, из которых лекарство постепенно выделяется в системный кровоток, где быстро гидролизует и превращается в нативную форму. Аналогичным образом действуют инъекции масляных растворов эфиров тестостерона и других стероидных гормонов в виде эфиров гидрофобных длинноцепочечных кислот [48].

Депонирование БАВ в поперечно-сшитых полимерных сетках

Сетчатые конструкции из поперечно-сшитых полимеров эффективны, если требуется контролируемое высвобождение гидрофильных макромолекул. Такие конструкции могут синтезироваться *in situ* в хо-

¹ Буквальный перевод «дендроны» неприменим, поскольку в русскоязычной литературе дендронами называют отростки нервных клеток.

де реакций с участием свободных радикалов, инициируемых тепловой энергией, фотонами или ионными взаимодействиями между свободными катионами и анионами полимера. Еще в прошлом веке [48] был запатентован термочувствительный биоразлагаемый сополимер лактида и капролактама для имплантации в область простаты в качестве резервуара для медленного высвобождения лекарственных средств. Позднее была отмечена опасность побочного эффекта, обусловленного необходимостью применения бензоилпероксида для генерирования свободных радикалов и связанного с этим возможного прогрессирования развития опухоли [49]. Еще позднее, в 2004 г. процесс формирования сетчатых полимерных депо был подробно изучен в экспериментах *in vitro* [50]. Было установлено, что лактид-гликолидный сополимер в присутствии бензил-бензоата образует гель, если его вводить в буферный раствор (имитация образования депо) или просто в процессе естественного старения. Высвобождение БАВ из депо происходит в процессе диффузии БАВ через сетку и усиливается в результате эрозии сетки. В форме основания БАВ высвобождается быстрее, чем в форме соли, что объясняется щелочным катализом процесса его гидролиза.

В общем случае в основе формирования депо *in situ* могут быть разные процессы: осаждение полимера, термически индуцированное загущение (желирование), образование различных микросфер, органелл и т. д.

К настоящему времени разработаны формы для пролонгированного действия белковых препаратов, представляющие собой пористые микросферы, получаемые путем электрораспыления смеси с биополимерами [51]. При электрораспылении под действием электрического поля образуется струя, извергаемая из отверстия в вершине конуса, и разлетающаяся на мелкие капли, застывающие в виде пористых микросфер.

Высвобождение БАВ «по требованию»

Высвобождение БАВ из депо может носить равномерный характер, но в последние годы усилия исследователей сосредоточены на разработке технологий высвобождения БАВ «по требованию» [52]. Выше были рассмотрены процессы модифицированного высвобождения БАВ, ориентированные на эндогенные стимулы, т. е. стимулы, формирование которых происходит внутри организма под влиянием физиологических факторов (изменение температуры, pH, ионной силы и т. д.). Высвобождение БАВ из депо может быть ответом и на внешние стимулы: воздействие ультразвука, электрического или магнитного поля, химических активаторов. В качестве последних могут выступать малые молекулы, инициирующие обратимые или необратимые конформационные изменения в полимерной матрице депо. Активация высвобождения БАВ под действием ультразвука особенно привлекательна для контролируемого трансдермального введения препаратов. Это направление частично пересекается с давно применяемыми технологиями фонофореза и микротоковой терапии. На рисунке 1, составленном на основе источника [53], проиллюстрировано разовое (А) и многократное (Б) высвобождение БАВ из депо под действием стимула. В первом случае структура полимера разрушается необратимо. Во втором случае по окончании действия стимула за счет восстановления сшивки (кросс-сопряжения) полимера депо восстанавливается, и при следующем воздействии стимула снова происходит высвобождение БАВ из полимерной матрицы.

Полимерные матрицы, способные к деструкции под действием ультразвука и последующему восстановлению структуры, описаны в работе [53].

Магнитные наночастицы [54] и магнитные липосомы [55] уже нашли применение в практике высвобождения лекарственных средств «по требованию». Магнитные частицы обладают хорошей биосовместимостью.

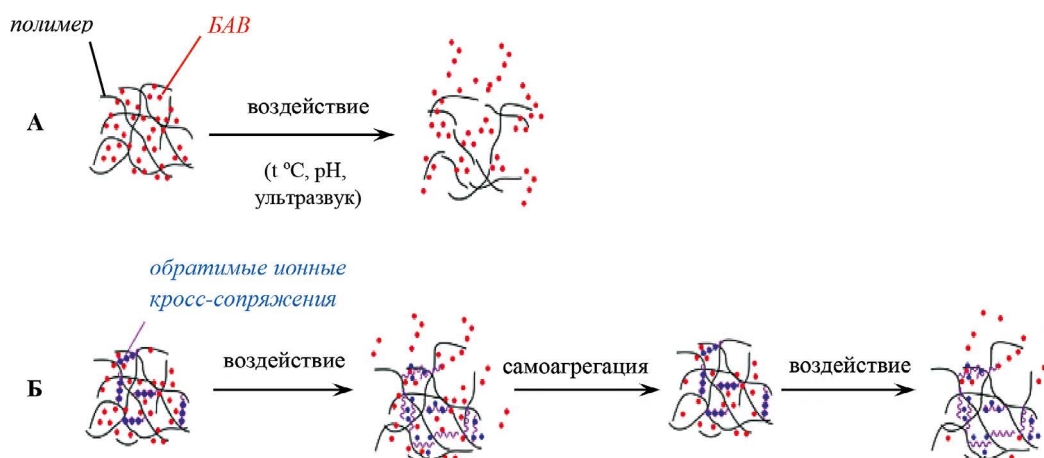


Рисунок 1. Одноразовое (А) и многократное (Б) высвобождение биологически активных веществ (БАВ) из депо

Figure 1. Single (A) and repeated (B) releasing biologically active compounds from depot

мостью, а воздействие магнитного поля рассматривается как относительно безопасное. Высвобождение БАВ из феррогеля может как непосредственно инициироваться действием магнитного поля, так и через индуцированное магнитным полем повышение температуры. Экспериментальные критерии для контроля качества магнитных наполнителей и магнитосодержащих лекарственных форм предложены в работах Ю. Я. Харитоновой с соавторами [56, 57]. Слабые электромагнитные стимулы эффективны для высвобождения БАВ из полиэлектrolитных депо. Воздействие электрического поля на матрицу полиэлектrolита нарушает его структуру вследствие потери воды, что и приводит к высвобождению БАВ [58].

Высвобождение БАВ, инициируемое химическим стимулом, имеет ряд преимуществ: в отличие от физических воздействий, химический стимул может быть легко доставлен током крови к целевым органам или тканям; не требуется применения оборудования, поскольку вещество-стимул можно принять в любом месте и в любое время. В то же время, вещество-стимул необходимо рассматривать как лекарственное средство с учетом возможных побочных эффектов, фармакологического взаимодействия, фармакокинетики и т. д. В качестве химических стимулов не только наиболее желательны с позиций биосовместимости, но и наиболее эффективны биогенные вещества, в частности нуклеиновые кислоты. Если в качестве депонирующих БАВ систем используются гидрогели на основе поперечно-сшитых нуклеотидов, введение комплементарных нуклеотидов может вызывать как набухание, так и потерю объема гидрогелей [59, 60].

Обеспечение целевой доставки БАВ

Важной тенденцией в фармацевтической разработке является обеспечение доставки БАВ в те локализации, в которых необходима реализация эффекта: мозг [61], глаза [62], легкие [63], слизистая оболочка носа [64], кожа [65, 66].

Эволюцию в разработке средств контролируемого высвобождения БАВ можно проследить на примере антипаразитарного препарата ивермектина. Кларком с соавторами [67] был разработан препарат, представляющий собой ивермектин, включенный в полимерную матрицу для долговременного действия. Препарат вводили путем инъекций. Позднее Камарго с соавторами [68] были разработаны образующиеся *in situ* микроимплантаты на основе биоразлагаемого полимера и биосовместимого растворителя, путь введения также оставался инъекционным. Лиззи [69] и Поллок [70] с соавторами в 2017 г. независимо опубликовали работы, подтверждающие возможность трансдермального введения ивермектина и его аналогов. В 2019 г. авторами [71] предложены самоимплантируемые микроиглы для контролируемой трансдермальной доставки ивермектина в качестве альтернативы традиционным парентеральным методам. Ивермектинин капсулирован в микрочастицы

сополимера молочной и гликолевой кислот. Микрочастицы включены в игольчатые волокна из полигалактуроновой кислоты, которые могут быть самостоятельно введены в требуемых локациях с помощью простейшего миниатюрного устройства.

В ноябре 2019 г. опубликована статья [72], в которой в эксперименте *in vitro* была доказана возможность целевой доставки БАВ в определенное место сосудистой стенки при воздействии ультразвука. В качестве контейнеров для доставки были использованы микропузырьки воздуха. Сфокусированное воздействие ультразвука обеспечивало управляемое движение микропузырьков вдоль стенки искусственного кровеносного сосуда (тонкой полимерной трубки), а при увеличении амплитуды колебаний ультразвуковых волн пузырьки лопались. Таким образом, достигались как целевая доставка БАВ, так и высвобождение «по требованию» в нужный момент времени. Такие эксперименты доказывают принципиальную возможность быстрого создания требуемой концентрации БАВ в строго определенной локации неинвазивными безинъекционными методами. Следует оговориться, однако, что в цитируемой работе представлена лишь модель, имитирующая кровоток и не учитывающая всех сложностей, которые неизбежно возникнут при ее воплощении в практику терапии. Лекарственные средства в их традиционной (немодифицированной) форме были разработаны при достижении определенного компромисса между желательными и фактическими параметрами: физико-химические и фармакокинетические свойства, режим дозирования, побочные эффекты и др. Обеспечивая быструю целевую доставку лекарственного средства, мы можем «сконцентрировать» побочные эффекты, в частности токсическое действие. С другой стороны, нельзя исключать из рассмотрения воздействие на организм, которое обусловлено средствами модификации/доставки БАВ как таковыми. Формирование депо, воздействие стимула могут расцениваться как вмешательства, последствия которых, в том числе и отдаленные, необходимо исследовать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нанотехнологии предоставили множество высокоорганизованных самоагрегированных многоуровневых объектов для биомедицинского применения. В их ряду самоагрегированные пептиды, по-видимому, стоит рассматривать в качестве наиболее перспективных для депонирования и стимул-ориентированных высвобождения/доставки БАВ. Современные тенденции развития процессов управляемых высвобождения/доставки БАВ отвечают запросам на менее инвазивные способы введения, целевые по локациям и времени реализации биологические эффекты. По мере совершенствования таких технологий «умные лекарства», способные распознавать и устранять проблему в очаге ее возникновения, из области маркетинговых деклараций будут перемещаться в реаль-

ность. При этом важно отметить, что повышая растворимость, биодоступность, селективность БАВ, изменяя их распределение в органах и тканях, добиваясь снижения известных негативных побочных эффектов, мы можем оказаться перед лицом проблем, которые априори не были предсказаны.

ЛИТЕРАТУРА

- Demina N. B. Current Trends in the Development of Technologies for Matrix Formulations with Modified Release. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016; 50(7): 475–480. DOI: 10.1007/s11094-016-1472-4.
- Краснюк (мл.) И. И., Овсянникова Л. В., Степанова О. И., Беляцкая А. В., Краснюк И. И., Харитонов Ю. Я., Грих В. В., Кошелева Т. М., Король Л. А. Применение твердых дисперсий с нестероидными противовоспалительными средствами в фармации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016; 2(15): 40–44. DOI: 10.1007/s11094-018-1799-0.
- Кузнецова И. Г., Дубовик Е. Г., Дубовик Н. С., Комаров Т. Н., Медведев Ю. В., Меньшикова Л. А., Северин С. Е., Шохин И. Е., Ярушок Т. А. Биораспределение полимерной транспортной формы рифабутин. *Вестник РАМН*. 2015; 70(3): 366–371. DOI: 10.15690/vramn.v70i3.1335.
- Loftsson T., Brewster M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J Pharm Pharmacol*. 2010; 62(11): 1607–1621. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2010.01030.x.
- Грачева И. М. Биотехнология биологически активных веществ. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений. – М.: Издательство НПО «Элевар». 2006: 453.
- Кедик С. А., Панов А. В., Тюкова В. С., Золотарева М. С. Циклодекстрины и их применение в фармацевтической промышленности (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016; 3(16): 68–75.
- Morrison P. W. J., Connon Ch. J., Khutoryanskiy V. V. Cyclodextrin-Mediated Enhancement of Riboflavin Solubility and Corneal Permeability. *Molecular Pharmaceutics*. 2013; 10(2): 756–762. DOI:10.1021/mp3005963.
- Scantlebury A. M., Ochodnicki P., Kors L. et al. β -cyclodextrin counteracts obesity in western diet-fed mice but elicits a nephrotoxic effect. *Scientific Reports*. 2019; 9: 17633. DOI: 10.1038/s41598-019-53890-z.
- Messner M., Kurkov S. V., Brewster M. E., Jansook P., Loftsson T. Self-assembly of cyclodextrin complexes: Aggregation of hydrocortisone/cyclodextrin complexes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011; 407: 174–183. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.01.011.
- Wu Ch., Xie O., Xu W., Tu M., Jiang L. Lattice self-assembly of cyclodextrin complexes and beyond Current. Opinion in Colloid & Interface Science. 2019; 39: 76–85. DOI: 10.1016/j.cocis.2019.01.002.
- Lucio D., Martinez-Oharriz M. C., Gonzalez-Navarro C. J., Navarro-Herrera D., Gonzalez-Gaitano G., Radulescu A., Irache J. M. Coencapsulation of cyclodextrins into poly (anhydride) nanoparticles to improve the oral administration of glibenclamide. A screening on C. elegans. *Colloids and surfaces Biointerfaces*. 2017. (163): 64–72. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.12.038.
- Lucio D., Martinez-Oharriz M. C., Gu Z., He Y., Aranaz P., Vizmanos J. L., Irache J. M. Cyclodextrin-grafted poly (anhydride) nanoparticles for oral glibenclamide administration. *In vivo* evaluation using C. elegans. *Int J Pharm*. 2018; 547(1–2): 97–105. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.05.064.
- Srinivasan M., Rajabi M., Mousa S. A. Multifunctional Nanomaterials and Their Applications in Drug Delivery and Cancer Therapy. *Nanomaterials*. 2015; 5(4): 1690–1703. DOI: 10.3390/nano5041690.
- Chaves P. D., Ourique A. F., Frank L. A., Pohlmann A. R., Guterres S. S., Beck R. C. Carvedilol-loaded nanocapsules: Mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. 2017; 114: 88–95. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.01.007.
- Vega E., Egea M. A., Garduno-Ramirez M. L., Garcia M. L., Sanchez E., Espina M., Calpena A. C. Flurbiprofen PLGA-PEG nanospheres: role of hydroxy-beta-cyclodextrin on ex vivo human skin permeation and in vivo topical anti-inflammatory efficacy. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 2013; 110: 339–346. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.04.045.
- Li I., Zhang J., Wang Z., Yao Y., Han X., Zhao Y., Liu J., Zhang S. Identification of a cyclodextrin inclusion complex of antimicrobial peptide CM4 and its antimicrobial activity. *Food Chemistry*. 2017; 221: 296–301 DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.040.
- Демина Н. Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 2(19): 56–60.
- Shingaki T., Hidalgo I. J., Furubayashi T., Sakane T., Katsumi H., Yamamoto A., Yamashita S. Nasal Delivery of P-gp Substrates to the Brain through the Nose–Brain Pathway. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2011; 26(3): 248–255. DOI: 10.2133/dmpk.dmpk-10-rg-108.
- Bitter C., Suter-Zimmermann K., Surbera C. Nasal Drug Delivery in Humans. *Current Problems in Dermatology*. 2011; 40: 20–35. DOI: 10.1159/000321044.
- Привалова А. М., Гуляева Н. В., Букреева Т. В. Интраназальное введение. Перспективный способ доставки лекарственных веществ в мозг. *Нейрохимия*. 2012; 29(2): 93–106.
- Horváth T., Ambrus R., Völgyi G., Budai-Szűcs M., Márki Á., Sipos P., Szabó-Révész P. Effect of solubility enhancement on nasal absorption of meloxicam. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 95: 96–102. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.05.031.
- Bartos C., Ambrus R., Sipos P., Budai-Szűcs M., Csányi E., Gáspár R., Márki Á., Seres A. B., Sztojkov-Ivanov A., Horváth T., Szabó-Révész P. Study of sodiumhyaluronate-based intranasal formulations containing micro- or nanosized meloxicamparticles. *Int. J. Pharm*. 2015; 491(1–2): 198–207. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.06.046.
- Deutel B., Laffleur F., Palmberger T., Saxer A., Thaler M., Bernkop-Schnürch A. *In vitro* characterization of insulin containing thiomeric microparticles as nasal drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 81: 157–161. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.10.022.
- Matsuyama T., Takahiro M., Horikiri Y. Influence of fillers in powder formulations containing N-acetyl-L-cysteine on nasal peptide absorption. *Journal of Controlled Release*. 2007; 120(1–2): 88–94. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.04.006.
- Bodor N. The soft drug approach. *Chemtech*. 1984; 14(1): 28–38.
- Matsuyama T., Morita T., Horikiri Y., Yamahara H., Yoshino H. Improved nasal absorption of salmon calcitonin by powdery formulation with N-acetyl-L-cysteine as a mucolytic agent. *Journal of Controlled Release*. 2006; 115(2): 183–188. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.08.004.
- Al-hazmi A. N-acetylcysteine as a therapeutic extract for cardiac, lung, intestine and spleen injuries induced by microcystin-LR in mice. *Journal of King Saud University – Science*. 2020; 32: 934–938. DOI: 10.1016/j.jksus.2019.06.001.
- Lee Y., Perry B. A., Labruno S., Lee H. S., Stern W., Falzone L. M., Sinko P. J. Impact of regional intestinal pH modulation on absorption of peptide drugs: oral absorption studies of salmon calcitonin in beagle dogs. *Pharmaceutical Research*. 1999; 16(8): 1233–1239. DOI: 10.1023/a:1014849630520.
- Ali A., Wahlgren M., Rembratt-Svensson B., Daftani A., Falkman P., Wollmer P., Engblom J. Dehydration affects drug transport over nasal mucosa. *Drug Delivery*. 2019; 26(1): 831–840. DOI: 10.1080/10717544.2019.1650848.
- He C., Zhuang X., Tang Z., Tian H., Chen X. Stimuli-Sensitive Synthetic Polypeptide-Based Materials for Drug and Gene Delivery. *Advanced Healthcare Materials*. 2011; 1(1): 48–78. DOI: 10.1002/adhm.201100008.
- Kricheldorf H. R. Polypeptides and 100 Years of Chemistry of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides. *Angewandte Chemie International Edition*. 2006; 45(35): 5752–5784. DOI: 10.1002/anie.200600693.
- Shah A., Malik M. S., Khan G. S., Nosheen E., Iftikhar F. J., Khan F. A., Aminabhavi T. M. Stimuli-responsive peptide-based biomaterials as drug delivery systems. *Chemical Engineering Journal*. 2018; 353: 559–583. DOI: 10.1016/j.cej.2018.07.126.
- Matson J. B., Zha R. H., Stupp S. I. Peptide self-assembly for crafting functional biological materials. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2011; 15(6): 225–235. DOI: 10.1016/j.cossms.2011.08.001.
- Wong S., Shim M. S., Kwon Y. J. Synthetically designed peptide-based biomaterials with stimuli-responsive and membrane-active properties for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B*. 2014; 2(6): 595–615. DOI: 10.1039/c3tb21344g.

35. Sankaranarayanan K., Meenakshisundaram N. Micro-viscosity induced conformational transitions in poly-L-lysine. *RSC Adv.* 2016; 6(78): 74009–74017. DOI: 10.1039/c6ra11626d.
36. Ito Y., Park Y. S., Imanishi Y. Nanometer-sized channel gating by a self-assembled polypeptide brush. *Langmuir.* 2000; 16(12): 5376–5381. DOI: 10.1021/la991102+.
37. Lee E. S., Shin H. J., Na K., Bae Y. H. Poly(L-histidine) – PEG block copolymer micelles and pH-induced destabilization. *Journal of Controlled Release.* 2003; 90(3): 363–374. DOI: 10.1016/s0168-3659(03)00205-0.
38. Chang G., Li C., Lu W., Ding J. N-Boc-Histidine-Capped PLGA-PEG-PLGA as a Smart Polymer for Drug Delivery Sensitive to Tumor Extracellular pH. *Macromolecular Bioscience.* 2010; 10(10): 1248–1256. DOI: 10.1002/mabi.201000117.
39. Chen P., Qiu M., Deng C., Meng F., Zhang J., Cheng R., Zhong Z. pH-Responsive Chimaeric Pepsomes Based on Asymmetric Poly(ethylene glycol)-b-Poly(L-leucine)-b-Poly(L-glutamic acid) Triblock Copolymer for Efficient Loading and Active Intracellular Delivery of Doxorubicin Hydrochloride. *Biomacromolecules.* 2015; 16(4): 1322–1330. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b00113.
40. Yan J., Liu K., Zhang X., Li W., Zhang A. Dynamic covalent polypeptides showing tunable secondary structures and thermoresponsiveness. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry.* 2014; 53(1): 33–41. DOI: 10.1002/pola.27433.
41. Hassouneh W., Zhulina E. B., Chilkoti A., Rubinstein M. Elastin-like Polypeptide Diblock Copolymers Self-Assemble into Weak Micelles. *Macromolecules.* 2015; 48(12): 4183–4195. DOI: 10.1021/acs.macromol.5b00431.
42. Ward M. A., Georgiou T. K. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers.* 2011; 3(3): 1215–1242. DOI: 10.3390/polym3031215.
43. Schwendeman S. P., Shah R. B., Bailey B. A., Schwendeman A. S. Injectable controlled release depots for large molecules. *Journal of Controlled Release.* 2014; 190: 240–253. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.05.057.
44. Rosenthal R. N., Ling W., Casadonte P., Vocci F., Bailey G. L., Kampman K., Beebe K. L. Buprenorphine implants for treatment of opioid dependence: randomized comparison to placebo and sublingual buprenorphine/naloxone. *Addiction.* 2013; 108(12): 2141–2149. DOI: 10.1111/add.12315.
45. Narukawa T., Soh J., Kanemitsu N., Harikai S., Ukimura O. Efficacy of combined treatment of intramuscular testosterone injection and testosterone ointment application for late-onset hypogonadism: an open-labeled, randomized, crossover study. *The Aging Male.* 2019; 1–7. DOI: 10.1080/13685538.2019.1666814.
46. Bowersock T. L., Martin S. Vaccine delivery to animals. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1999; 38(2): 167–194. DOI: 10.1016/s0169-409x(99)00015-0.
47. Dubey A., Shami T. Metamaterials in Electromagnetic Wave Absorbers. *Defence Science Journal.* 2012; 62(4): 261–268. DOI: 10.14429/dsj.62.1514.
48. Dunn R. L., English J. P., Cowsar D. R., Vanderbelt D. D. Biodegradable in-situ forming implants and method for producing the same. *US Patent 23 Aug.* 1994; 5: 340849.
49. Saleem M. A., Ahmed S. I. Tephrosiapurpurea ameliorates benzoyl peroxide-induced cutaneous toxicity in mice: diminution of oxidative stress. *Pharm Pharmacol Commun.* 1999; 5(7): 455–461. DOI: 10.1211/146080899128735162.
50. Wang L., Venkatraman S., Kleiner L. Drug release from injectable depots: two different in vitro mechanisms. *J Control Release.* 2004; 99(2): 207–216. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.06.021.
51. Paik D. H., Choi S. W. Entrapment of Protein Using Electrospayed Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Microspheres with a Porous Structure for Sustained Release. *Macromolecular Rapid Communications.* 2014; 35(11): 1033–1038. DOI: 10.1002/marc.201400042.
52. Brudno Y., Mooney D. J. On-demand drug delivery from local depots. *Journal of Controlled Release.* 2015; 219: 8–17. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.09.011.
53. Kwok C. S., Mourad P. D., Crum L. A., Self-assembled molecular structures as ultrasonically-responsive barrier membranes for pulsatile drug delivery. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001; 57(2): 151–164. DOI: 10.1002/1097-4636(200111)57:2<151::aid-jbm1154>3.0.co;2-5.
54. Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander E. L., Muller R. N. ChemInform Abstract: Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *ChemInform.* 2008; 39(35). DOI: 10.1002/chin.200835229.
55. Preiss M. R., Bothun G. D. Stimuli-responsive liposome-nanoparticle assemblies. *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2011; 8(8): 1025–1040. DOI: 10.1517/17425247.2011.584868.
56. Харитонов Ю. Я., Черкасова О. Г., Завадский С. П., Цыбусов С. Н., Краснюк И. И. (мл.), Григорьева В. Ю. Контроль качества магнитных наполнителей для магнитных лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2016; 3(16): 112–117.
57. Харитонов Ю. Я., Черкасова О. Г., Завадский С. П., Шабалкина Е. Ю., Краснюк И. И. (мл.), Григорьева В. Ю., Цыбусов С. Н., Абизов Е. А. Разработка способов и методик контроля качества магнитных лечебных средств (магнитных масел, магнитных суппозиториях, железоуглеродного компонента для криохирургии). *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2016; 4(17): 100–106.
58. Murdan, S. Electro-responsive drug delivery from hydrogels. *Journal of Controlled Release.* 2003; 92(1-2): 1–17. DOI: 10.1016/s0168-3659(03)00303-1.
59. Murakami Y., Maeda M. DNA-Responsive Hydrogels That Can Shrink or Swell. *Biomacromolecules.* 2005; 6(6): 2927–2929. DOI: 10.1021/bm0504330.
60. Murakami Y., Maeda M. Hybrid Hydrogels to Which Single-Stranded (ss) DNA Probe Is Incorporated Can Recognize Specific ssDNA. *Macromolecules.* 2005; 38(5): 1535–1537. DOI: 10.1021/ma047803h.
61. Wang Z. H., Wang Z. Y., Sun C. S., Wang C. Y., Jiang T. Y., Wang S. L. Trimethylated chitosan-conjugated PLGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *Biomaterials.* 2010; 31(5): 908–915. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.104.
62. Sultana Y., Maurya D. P., Iqbal Z., Aqil M. Nanotechnology in ocular delivery: current and future directions. *Drugs Today.* 2011; 47(6): 441–455. DOI: 10.1358/dot.2011.47.6.1549023.
63. Patlolla R. R., Chougule M., Patel A. R., Jackson T., Tata P. N., Singh M. Formulation, characterization and pulmonary deposition of nebulized celecoxib encapsulated nanostructured lipid carriers. *J Control Release.* 2010; 144(2): 233–241. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.02.006.
64. Slutter B., Bal S., Keijzer C., Mallants R., Hagenaars N., Que I. et al. Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen. *Vaccine.* 2010; 28 (38): 6282–6291. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.06.121.
65. Lee P. W., Hsu S. H., Tsai J. S., Chen F. R., Huang P. J., Ke C. J. et al. Multifunctional core-shell polymeric nanoparticles for transdermal DNA delivery and epidermal langerhans cells tracking. *Biomaterials.* 2010; 31(8): 2425–2434. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.100.
66. Barry B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2001; 14(2): 101–114. DOI: 10.1016/s0928-0987(01)00167-1.
67. Clark S. L., Crowley A. J., Schmidt P. G., Donoghue A. R., Piche C. A. Long-term delivery of ivermectin by use of poly(D, L-lactic-co-glycolic) acid microparticles in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 2004; 65(6): 752–757. DOI: 10.2460/ajvr.2004.65.752.
68. Camargo J. A., Sapin A., Nouvel C., Daloz D., Leonard M., Bonneaux F., Six J. L., Maincent P. Injectable PLA-based in situ forming implants for controlled release of ivermectin a BCS Class II drug: solvent selection based on physico-chemical characterization. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2012; 39(1): 146–155. DOI: 10.3109/03639045.2012.660952.
69. Iezzi S., Purslow P., Sara C., Lanusse C., Lifschitz A. Relationship between ivermectin concentrations at the injection site, muscle and fat of steers treated with traditional and long-acting preparations. *Food and Chemical Toxicology.* 2017; 105: 319–321. DOI: 10.1016/j.fct.2017.05.005.
70. Pollock J., Bedenice D., Jennings S. H., Papich M. G. Pharmacokinetics of an extended-release formulation of eprinomectin in healthy adult alpacas and its use in alpacas confirmed with mange. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2016; 40(2): 192–199. DOI: 10.1111/jvp.12341.
71. Chen B. Z., Yang Y., Wang B. B., Ashfaq M., Guo, X. D. Self-implanted tiny needles as alternative to traditional parenteral administrations for controlled transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics.* 2019; 556: 338–348. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.019.

72. Peng H., Qian X., Mao L., Jiang L., Sun Y., Zhou Q. Ultrafast ultrasound imaging in acoustic microbubble trapping. *Applied Physics Letters*. 2019; 115(20): 203701. DOI: 10.1063/1.5124437.

REFERENCES

1. Demina N. B. Current Trends in the Development of Technologies for Matrix Formulations with Modified Release. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016; 50(7): 475–480. DOI: 10.1007/s11094-016-1472-4.
2. Krasnuk (Junior) I. I., Ovsyannikova L. V., Stepanova O. I., Belyatskaya A. V., Krasnuk I. I., Kharitonov Y. Y., Grikh V. V., Kosheleva T. M., Korol L. A. Application of solid dispersions with non steroidal anti inflammatory drugs in pharmacy. *Drug development & registration*. 2016; 2(15): 40–44. DOI: 10.1007/s11094-018-1799-0 (in Russ.).
3. Kuznetsova I. G., Dubovik E. G., Dubovik N. S., Komarov T. N., Medvedev Yu. V., Men'shikova L. A., Severin S. E., Shohin I. E., Yarushok T. A. Biodistribution of the polymer transport form of rifabutin. *Bulletin of RAMS*. 2015; 70 (3): 366–371. DOI: 10.15690/vramn.v70i3.1335 (in Russ.).
4. Loftsson T., Brewster M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J Pharm Pharmacol*. 2010; 62(11): 1607–1621. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2010.01030.x.
5. Gracheva I. M. Biotechnology of biologically active substances. Textbook for students of higher educational institutions. – M.: Publishing house of NPO «Elevar». 2006: 453 (in Russ.).
6. Kedik S. A., Panov A. V., Tyukova V. S., Zolotareva M. S. Cyclodextrins and their application in pharmaceutical industry. *Drug development & registration*. 2016; 3(16): 68–75 (in Russ.).
7. Morrison P. W. J., Connon Ch. J., Khutoryanskiy V. V. Cyclodextrin-Mediated Enhancement of Riboflavin Solubility and Corneal Permeability. *Molecular Pharmaceutics*. 2013; 10(2): 756–762. DOI: 10.1021/mp3005963.
8. Scantlebury A. M., Ochodnický P., Kors L. et al. β -cyclodextrin counteracts obesity in western diet-fed mice but elicits a nephrotoxic effect. *Scientific Reports*. 2019; 9: 17633. DOI: 10.1038/s41598-019-53890-z.
9. Messner M., Kurkov S. V., Brewster M. E., Jansook P., Loftsson T. Self-assembly of cyclodextrin complexes: Aggregation of hydrocortisone/cyclodextrin complexes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011; 407: 174–183. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.01.011.
10. Wu Ch., Xie O., Xu W., Tu M., Jiang L. Lattice self-assembly of cyclodextrin complexes and beyond Current. *Opinion in Colloid & Interface Science*. 2019; 39: 76–85. DOI: 10.1016/j.cocis.2019.01.002.
11. Lucio D., Martinez-Oharriz M. C., Gonzalez-Navarro C. J., Navarro-Herrera D., Gonzalez-Gaitano G., Radulescu A., Irache J. M. Coencapsulation of cyclodextrins into poly (anhydride) nanoparticles to improve the oral administration of glibenclamide. A screening on *C. elegans*. *Colloids and surfaces Biointerfaces*. 2017. (163): 64–72. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.12.038.
12. Lucio D., Martinez-Oharriz M. C., Gu Z., He Y., Aranaz P., Vizmanos J. L., Irache J. M. Cyclodextrin-grafted poly (anhydride) nanoparticles for oral glibenclamide administration. *In vivo* evaluation using *C. elegans*. *Int J Pharm*. 2018; 547(1-2): 97–105. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.05.064.
13. Srinivasan M., Rajabi M., Mousa S. A. Multifunctional Nanomaterials and Their Applications in Drug Delivery and Cancer Therapy. *Nanomaterials*. 2015; 5(4): 1690–1703. DOI: 10.3390/nano5041690.
14. Chaves P. D., Ourique A. F., Frank L. A., Pohlmann A. R., Guterres S. S., Beck R. C. Carvedilol-loaded nanocapsules: Mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2017; 114: 88–95. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.01.007.
15. Vega E., Egea M. A., Garduno-Ramirez M. L., Garcia M. L., Sanchez E., Espina M., Calpena A. C. Flurbiprofen PLGA-PEG nanospheres: role of hydroxy-beta-cyclodextrin on ex vivo human skin permeation and in vivo topical anti-inflammatory efficacy. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 2013; 110: 339–346. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.04.045.
16. Li I., Zhang J., Wang Z., Yao Y., Han X., Zhao Y., Liu J., Zhang S. Identification of a cyclodextrin inclusion complex of antimicrobial peptide CM4 and its antimicrobial activity. *Food Chemistry*. 2017; 221: 296–301. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.040.
17. Demina N. B. Biopharmaceutical classification system as a tool for the development of drug formulations and their designs. *Drug development & registration*. 2017; 2(19): 56–60 (in Russ.).
18. Shingaki T., Hidalgo I. J., Furubayashi T., Sakane T., Katsumi H., Yamamoto A., Yamashita S. Nasal Delivery of P-gp Substrates to the Brain through the Nose–Brain Pathway. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2011; 26(3): 248–255. DOI: 10.2133/dmpk.dmpk-10-rg-108.
19. Bitter C., Suter-Zimmermann K., Surbera C. Nasal Drug Delivery in Humans. *Current Problems in Dermatology*. 2011; 40: 20–35. DOI: 10.1159/000321044.
20. Privalova A. M., Bukreeva T. V., Gulyaeva N. V. Intranasal administration: A prospective drug delivery route to the brain. *Neurochemical Journal*. 2012; 6(2): 77–88. DOI: 10.1134/s1819712412020080 (in Russ.).
21. Horváth T., Ambrus R., Völgyi G., Budai-Szűcs M., Márki Á., Sipos P., Szabó-Révész P. Effect of solubility enhancement on nasal absorption of meloxicam. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 95: 96–102. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.05.031.
22. Bartos C., Ambrus R., Sipos P., Budai-Szűcs M., Csányi E., Gáspár R., Márki Á., Seres A. B., Sztojok-Ivanov A., Horváth T., Szabó-Révész P. Study of sodiumhyaluronate-based intranasal formulations containing micro- or nanosized meloxicamparticles. *Int. J. Pharm*. 2015; 491(1-2): 198–207. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.06.046.
23. Deutel B., Laffleur F., Palmberger T., Saxer A., Thaler M., Bernkop-Schnürch A. *In vitro* characterization of insulin containing thiomericmicroparticles as nasal drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 81: 157–161. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.10.022.
24. Matsuyama T., Takahiro M., Horikiri Y. Influence of fillers in powder formulations containing N-acetyl-L-cysteine on nasal peptide absorption. *Journal of Controlled Release*. 2007; 120(1-2): 88–94. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.04.006.
25. Bodor N. The soft drug approach. *Chemtech*. 1984; 14(1): 28–38.
26. Matsuyama T., Morita T., Horikiri Y., Yamahara H., Yoshino H. Improved nasal absorption of salmon calcitonin by powdery formulation with N-acetyl-L-cysteine as a mucolytic agent. *Journal of Controlled Release*. 2006; 115(2): 183–188. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.08.004.
27. Al-hazmi A. N-acetylcysteine as a therapeutic extract for cardiac, lung, intestine and spleen injuries induced by microcystin-LR in mice. *Journal of King Saud University – Science*. 2020; 32: 934–938. DOI: 10.1016/j.jksus.2019.06.001.
28. Lee Y., Perry B. A., Labruno S., Lee H. S., Stern W., Falzone L. M., Sinko P. J. Impact of regional intestinal pH modulation on absorption of peptide drugs: oral absorption studies of salmon calcitonin in beagle dogs. *Pharmaceutical Research*. 1999; 16(8): 1233–1239. DOI: 10.1023/a:1014849630520.
29. Ali A., Wahlgren M., Rembratt-Svensson B., Daftani A., Falkman P., Wollmer P., Engblom J. Dehydration affects drug transport over nasal mucosa. *Drug Delivery*. 2019; 26(1): 831–840. DOI: 10.1080/10717544.2019.1650848.
30. He C., Zhuang X., Tang Z., Tian H., Chen X. Stimuli-Sensitive Synthetic Polypeptide-Based Materials for Drug and Gene Delivery. *Advanced Healthcare Materials*. 2011; 1(1): 48–78. DOI: 10.1002/adhm.201100008.
31. Kricheldorf H. R. Polypeptides and 100 Years of Chemistry of α -Amino Acid-N-Carboxyanhydrides. *Angewandte Chemie International Edition*. 2006; 45(35): 5752–5784. DOI: 10.1002/anie.200600693.
32. Shah A., Malik M. S., Khan G. S., Nosheen E., Iftikhar F. J., Khan F. A., Aminabhavi T. M. Stimuli-responsive peptide-based biomaterials as drug delivery systems. *Chemical Engineering Journal*. 2018; 353: 559–583. DOI: 10.1016/j.cej.2018.07.126.
33. Matson J. B., Zha R. H., Stupp S. I. Peptide self-assembly for crafting functional biological materials. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2011; 15(6): 225–235. DOI: 10.1016/j.cossms.2011.08.001.
34. Wong S., Shim M. S., Kwon Y. J. Synthetically designed peptide-based biomaterials with stimuli-responsive and membrane-active properties for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B*. 2014; 2(6): 595–615. DOI: 10.1039/c3tb21344g.
35. Sankaranarayanan K., Meenakshisundaram N. Micro-viscosity induced conformational transitions in poly-L-lysine. *RSC Adv*. 2016; 6(78): 74009–74017. DOI: 10.1039/c6ra11626d.

36. Ito Y., Park Y. S., Imanishi Y. Nanometer-sized channel gating by a self-assembled polypeptide brush. *Langmuir*. 2000; 16(12): 5376–5381. DOI: 10.1021/la991102+.
37. Lee E. S., Shin H. J., Na K., Bae Y. H. Poly(L-histidine) – PEG block copolymer micelles and pH-induced destabilization. *Journal of Controlled Release*. 2003; 90(3): 363–374. DOI: 10.1016/s0168-3659(03)00205-0.
38. Chang G., Li C., Lu W., Ding J. N-Boc-Histidine-Capped PLGA-PEG-PLGA as a Smart Polymer for Drug Delivery Sensitive to Tumor Extracellular pH. *Macromolecular Bioscience*. 2010; 10(10): 1248–1256. DOI: 10.1002/mabi.201000117.
39. Chen P., Qiu M., Deng C., Meng F., Zhang J., Cheng R., Zhong Z. pH-Responsive Chimeric Pepsomes Based on Asymmetric Poly(ethylene glycol)-b-Poly(L-leucine)-b-Poly(L-glutamic acid) Triblock Copolymer for Efficient Loading and Active Intracellular Delivery of Doxorubicin Hydrochloride. *Biomacromolecules*. 2015; 16(4): 1322–1330. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b00113.
40. Yan J., Liu K., Zhang X., Li W., Zhang A. Dynamic covalent polypeptides showing tunable secondary structures and thermoresponsiveness. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2014; 53(1): 33–41. DOI: 10.1002/pola.27433.
41. Hassouneh W., Zhulina E. B., Chilkoti A., Rubinstein M. Elastin-like Polypeptide Diblock Copolymers Self-Assemble into Weak Micelles. *Macromolecules*. 2015; 48(12): 4183–4195. DOI: 10.1021/acs.macromol.5b00431.
42. Ward M. A., Georgiou T. K. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers*. 2011; 3(3): 1215–1242. DOI: 10.3390/polym3031215.
43. Schwendeman S. P., Shah R. B., Bailey B. A., Schwendeman A. S. Injectable controlled release depots for large molecules. *Journal of Controlled Release*. 2014; 190: 240–253. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.05.057.
44. Rosenthal R. N., Ling W., Casadonte P., Vocci F., Bailey G. L., Kampman K., Beebe K. L. Buprenorphine implants for treatment of opioid dependence: randomized comparison to placebo and sublingual buprenorphine/naloxone. *Addiction*. 2013; 108(12): 2141–2149. DOI: 10.1111/add.12315.
45. Narukawa T., Soh J., Kanemitsu N., Harikai S., Ukimura O. Efficacy of combined treatment of intramuscular testosterone injection and testosterone ointment application for late-onset hypogonadism: an open-labeled, randomized, crossover study. *The Aging Male*. 2019; 1–7. DOI: 10.1080/13685538.2019.1666814.
46. Bowersock T. L., Martin S. Vaccine delivery to animals. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1999; 38(2): 167–194. DOI: 10.1016/s0169-409x(99)00015-0.
47. Dubey A., Shami T. Metamaterials in Electromagnetic Wave Absorbers. *Defence Science Journal*. 2012; 62(4): 261–268. DOI: 10.14429/dsj.62.1514.
48. Dunn R. L., English J. P., Cowsar D. R., Vanderbelt D. D. Biodegradable in-situ forming implants and method for producing the same. *US Patent 23 Aug*. 1994; 5: 340849.
49. Saleem M. A., Ahmed S. I. Tephrosiapurpurea ameliorates benzoyl peroxide-induced cutaneous toxicity in mice: diminution of oxidative stress. *Pharm Pharmacol Commun*. 1999; 5(7): 455–461. DOI: 10.1211/146080899128735162.
50. Wang L., Venkatraman S., Kleiner L. Drug release from injectable depots: two different in vitro mechanisms. *J Control Release*. 2004; 99(2): 207–216. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.06.021.
51. Paik D. H., Choi S. W. Entrapment of Protein Using Electrospayed Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Microspheres with a Porous Structure for Sustained Release. *Macromolecular Rapid Communications*. 2014; 35(11): 1033–1038. DOI: 10.1002/marc.201400042.
52. Brudno Y., Mooney D. J. On-demand drug delivery from local depots. *Journal of Controlled Release*. 2015; 219: 8–17. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.09.011.
53. Kwok C. S., Mourad P. D., Crum L. A., Self-assembled molecular structures as ultrasonically-responsive barrier membranes for pulsatile drug delivery. *J. Biomed. Mater. Res*. 2001; 57(2): 151–164. DOI: 10.1002/1097-4636(200111)57:2<151::aid-jbm1154>3.0.co;2-5.
54. Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander E. L., Muller R. N. ChemInform Abstract: Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *ChemInform*. 2008; 39(35). DOI: 10.1002/chin.200835229.
55. Preiss M. R., Bothun G. D. Stimuli-responsive liposome-nanoparticle assemblies. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2011; 8(8): 1025–1040. DOI: 10.1517/17425247.2011.584868.
56. Kharitonov Y. Y., Cherkasova O. G., Zavadskiy S. P., Tsybusov S. N., Krasnyuk (Jr) I. I., Grigorjeva V. Y. Quality control of magnetic fillers for magnetic formulations. *Drug development & registration*. 2016; 3(16): 100–106 (in Russ.).
57. Kharitonov Y. Y., Cherkasova O. G., Zavadskiy S. P., Shabalkina E. Y., Krasnyuk (Jr) I. I., Grigorjeva V. Y., Tsybusov S. N., Abizov E. A. Development of the procedures of quality control of magnetic medications (magnetic medical ointments, magnetic suppositories, iron-carbon composite for the cryosurgery). *Drug development & registration*. 2016; (4): 112–117 (in Russ.).
58. Murdan, S. Electro-responsive drug delivery from hydrogels. *Journal of Controlled Release*. 2003; 92(1-2): 1–17. DOI: 10.1016/s0168-3659(03)00303-1.
59. Murakami Y., Maeda M. DNA-Responsive Hydrogels That Can Shrink or Swell. *Biomacromolecules*. 2005; 6(6): 2927–2929. DOI: 10.1021/bm0504330.
60. Murakami Y., Maeda M. Hybrid Hydrogels to Which Single-Stranded (ss) DNA Probe Is Incorporated Can Recognize Specific ssDNA. *Macromolecules*. 2005; 38(5): 1535–1537. DOI: 10.1021/ma047803h.
61. Wang Z. H., Wang Z. Y., Sun C. S., Wang C. Y., Jiang T. Y., Wang S. L. Trimethylated chitosan-conjugated PLGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *Biomaterials*. 2010; 31(5): 908–915. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.104.
62. Sultana Y., Maurya D. P., Iqbal Z., Aqil M. Nanotechnology in ocular delivery: current and future directions. *Drugs Today*. 2011; 47(6): 441–455. DOI: 10.1358/dot.2011.47.6.1549023.
63. Patlolla R. R., Chougule M., Patel A. R., Jackson T., Tata P. N., Singh M. Formulation, characterization and pulmonary deposition of nebulized celecoxib encapsulated nanostructured lipid carriers. *J Control Release*. 2010; 144(2): 233–241. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.02.006.
64. Slutter B., Bal S., Keijzer C., Mallants R., Hagenaars N., Que I. et al. Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen. *Vaccine*. 2010; 28 (38): 6282–6291. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.06.121.
65. Lee P. W., Hsu S. H., Tsai J. S., Chen F. R., Huang P. J., Ke C. J. et al. Multifunctional coreshell polymeric nanoparticles for transdermal DNA delivery and epidermal langerhans cells tracking. *Biomaterials*. 2010; 31(8): 2425–2434. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.100.
66. Barry B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2001; 14(2): 101–114. DOI: 10.1016/s0928-0987(01)00167-1.
67. Clark S. L., Crowley A. J., Schmidt P. G., Donoghue A. R., Piche C. A. Long-term delivery of ivermectin by use of poly(D, L-lactic-co-glycolic) acid microparticles in dogs. *Am. J. Vet. Res*. 2004; 65(6): 752–757. DOI: 10.2460/ajvr.2004.65.752.
68. Camargo J. A., Sapin A., Nouvel C., Daloz D., Leonard M., Bonneaux F., Six J. L., Maincent P. Injectable PLA-based in situ forming implants for controlled release of ivermectin a BCS Class II drug: solvent selection based on physico-chemical characterization. *Drug Dev. Ind. Pharm*. 2012; 39(1): 146–155. DOI: 10.3109/03639045.2012.660952.
69. Iezzi S., Purslow P., Sara C., Lanusse C., Lifschitz A. Relationship between ivermectin concentrations at the injection site, muscle and fat of steers treated with traditional and long-acting preparations. *Food and Chemical Toxicology*. 2017; 105: 319–321. DOI: 10.1016/j.fct.2017.05.005.
70. Pollock J., Bedenice D., Jennings S. H., Papich M. G. Pharmacokinetics of an extended-release formulation of eprinomectin in healthy adult alpacas and its use in alpacas confirmed with mange. *J. Vet. Pharmacol. Ther*. 2016; 40(2): 192–199. DOI: 10.1111/jvp.12341.
71. Chen B. Z., Yang Y., Wang B. B., Ashfaq M., Guo, X. D. Self-implanted tiny needles as alternative to traditional parenteral administrations for controlled transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019; 556: 338–348. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.019.
72. Peng H., Qian X., Mao L., Jiang L., Sun Y., Zhou Q. Ultrafast ultrasound imaging in acoustic microbubble trapping. *Applied Physics Letters*. 2019; 115(20): 203701. DOI: 10.1063/1.5124437.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-67-71>
УДК 615.014.2



Оригинальная статья/Research article

Изучение стабильности вязкого раствора нафтифина гидрохлорида с комбинацией полиэтиленгликолей для наружного применения

С. И. Косенкова^{1*}, И. И. Краснюк¹, И. И. Краснюк (мл.)¹, А. В. Беязцкая¹, О. И. Степанова¹,
Е. В. Мазяркин¹, Т. В. Корочкина¹, Ю. Я. Харитонов¹

1 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

*Контактное лицо: Косенкова Светлана Игоревна. E-mail: sv-omega@yandex.ru

Статья получена: 12.02.2020. Статья принята к печати: 27.03.2020

Резюме

Введение. В лаборатории Сеченовского Университета разработан инновационный противогрибковый вязкий раствор на основе нафтифина гидрохлорида с комбинацией полиэтиленгликолей (ПЭГ). Разработанный препарат предназначен для наружного применения. Действующее вещество – нафтифина гидрохлорид, имеет широкий спектр действия в отношении грибов, вызывающих онихомикозы. Входящие в состав разработанной лекарственной формы полиэтиленгликоли обеспечивают необходимую вязкость раствора (для точности нанесения и удержания в области применения). В работе представлены результаты исследования стабильности вязкого раствора нафтифина гидрохлорида с комбинацией ПЭГов для наружного применения. На протяжении всего срока годности лекарственный препарат должен сохранять химические, физические, биофармацевтические и фармакологические свойства в полном объеме.

Цель. Определение стабильности и установление срока годности разработанного раствора нафтифина гидрохлорида для наружного применения, предназначенного для лечения микоза ногтей.

Материалы и методы. 1 % раствор нафтифина гидрохлорида спиртовой, фильтр «Миллипор», УФ-спектрофотометрия, pH-потенциометрия, капиллярная вискозиметрия.

Результаты и обсуждение. В ходе исследования был экспериментально определен срок годности разработанного спиртового раствора нафтифина гидрохлорида с комбинацией ПЭГов. Определение стабильности лекарственной формы проводили методом ускоренного старения при температуре $40 \pm 2^\circ\text{C}$, в естественных условиях при температуре не выше 25°C ; и в условиях холодильника при температуре $8 \pm 2^\circ\text{C}$. Оценка стабильности спиртового раствора нафтифина гидрохлорида проводилась по следующим показателям: объем содержимого флакона, внешний вид, pH, количественное содержание действующего вещества, вязкость.

Заключение. На основании проведенных исследований рекомендовано хранить раствор нафтифина гидрохлорида при комнатной температуре не выше 25°C , в защищенном от света месте. Допускается также хранение раствора нафтифина гидрохлорида в холодильнике при температуре $8 \pm 2^\circ\text{C}$.

Ключевые слова: хранение, нафтифина гидрохлорид, вязкость, УФ-спектрофотометрия, pH.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы С. И. Косенкова, И. И. Краснюк, И. И. Краснюк (мл.) занимались разработкой эксперимента. С. И. Косенкова, А. В. Беязцкая, О. И. Степанова, Е. В. Мазяркин участвовали в обработке полученных данных. С. И. Косенкова, И. И. Краснюк (мл.) участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении.

Для цитирования: Косенкова С. И., Краснюк И. И., Краснюк И. И. (мл.), Беязцкая А. В., Степанова О. И., Мазяркин Е. В., Корочкина Т. В., Харитонов Ю. Я. Изучение стабильности вязкого раствора нафтифина гидрохлорида с комбинацией полиэтиленгликолей для наружного применения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 67–71.

Study of the Stability of a Viscous Solution of Naftifin Hydrochloride with a Combination of Polyethylene Glycols for External Use

Svetlana I. Kosenkova^{1*}, Ivan I. Krasnyuk¹, Ivan I. Krasnyuk (jr.)¹, Anastasia V. Belyatskaya¹,
Olga I. Stepanova¹, Egor V. Mazyarkin¹, Tatyana V. Korochkina¹, Yuriy Ya. Kharitonov¹

1 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Svetlana I. Kosenkova. E-mail: sv-omega@yandex.ru

Received: 12.02.2020. Accepted: 27.03.2020

Abstract

Introduction. An innovative antifungal viscous solution based on naftifine hydrochloride with a combination of polyethylene glycols (PEG) was developed in the laboratory of Sechenov University. The developed preparation intended for external use. The active ingredient – naftifine hydrochloride has a wide spectrum of action against fungi cause onychomycosis. The polyethylene glycols are included in the developed dosage form of provide the necessary viscosity of the solution (for accurate application and retention in the field of application). The paper presents the results of a study of the stability of a viscous solution of naftifine hydrochloride with a combination of PEG for external use. Over the entire shelf life, the drug must retain the full its chemical, physical, biopharmaceutical and pharmacological properties.

Aim. Determination of stability and expiration date of the shelf life of the developed solution of naftifine hydrochloride for external use, intended for the treatment of mycosis of the nail.

Materials and methods. Naftifine hydrochloride solution, «Millipor» filter, UV spectrophotometry, potentiometry pH, capillary viscometry.

© Косенкова С. И., Краснюк И. И., Краснюк И. И. (мл.), Беязцкая А. В., Степанова О. И., Мазяркин Е. В., Корочкина Т. В., Харитонов Ю. Я., 2020

© Kosenkova S. I., Krasnyuk I. I., Krasnyuk I. I. (jr.), Belyatskaya A. V., Stepanova O. I., Mazyarkin E. V., Korochkina T. V., Kharitonov Yu. Ya., 2020

Results and discussion. In the course of the study, the shelf life of the developed alcohol solution of naftifin hydrochloride with a combination of PEG was experimentally determined. The stability of the dosage form was determined by accelerated aging at a temperature of $40 \pm 2^\circ\text{C}$, *in vivo* at a temperature of no higher than 25°C ; and in a refrigerator at a temperature of $8 \pm 2^\circ\text{C}$. Assessment of the stability of the alcohol solution of naftifin hydrochloride was carried out according to the following indicators: the volume of the contents of the bottle, appearance, pH, quantitative content of the active substance, viscosity.

Conclusion. Based on the studies, it is recommended to store the naftifin hydrochloride solution at room temperature not higher than 25°C , in a dark place. It is also allowed to store the solution of naftifin hydrochloride in a refrigerator at a temperature of $8 \pm 2^\circ\text{C}$.

Keywords: storage, naftifin hydrochloride, viscosity, UV spectrophotometry, pH.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Authors Svetlana I. Kosenkova, Ivan I. Krasnyuk, Ivan I. Krasnyuk (jr.) were engaged in the development of the experiment. Svetlana I. Kosenkova, Anastasia V. Belaytskaya, Olga I. Stepanova, Egor V. Mazyarkin took part in processing the received data. Svetlana I. Kosenkova, Ivan I. Krasnyuk (jr.) took part in writing the text of the article. All the authors participated in the discussion.

For citation: Kosenkova S. I., Krasnyuk I. I., Krasnyuk I. I. (jr.), Belyatskaya A. V., Stepanova O. I., Mazyarkin E. V., Korochkina T. V., Kharitonov Yu. Ya. Study of the stability of a viscous solution of naftifin hydrochloride with a combination of polyethylene glycols for external use. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 67–71.

ВВЕДЕНИЕ

Онихомикоз – грибковое поражение ногтевых пластин кистей и стоп. В России количество больных онихомикозами варьируется от 4,5 до 15 миллионов человек. Распространение грибка ногтей зависит от образа жизни, нарушения соблюдения правил личной гигиены, пола и возраста пациента, а также от сопутствующих заболеваний и других факторов. Большинство населения отдает предпочтение местному лечению онихомикоза. Главное преимущество местной терапии – отсутствие сильных побочных и токсических эффектов на организм человека [5]. Разработка новых противогрибковых препаратов очень актуальна. Был разработан инновационный антимикотический препарат, содержащий нафтифина гидрохлорида 0,5 г, спирт этиловый 96 % – 8,0 г, ПЭГ-400 – 33,20 г и ПЭГ-1000 – 8,30 г. Данный раствор обладает высокой вязкостью и противогрибковой активностью [3]. Важным показателем качества разработанного спиртового раствора нафтифина гидрохлорида в процессе хранения является стабильность внешнего вида (цвет, прозрачность), физико-химических характеристик и концентрации основного действующего вещества. Ввиду того, что срок годности лекарственного средства зависит от множества факторов (температуры, воздействия света, герметичности упаковки), изменение любого из них может привести к снижению терапевтического эффекта препарата [4].

Изучение стабильности разработанного спиртового раствора нафтифина гидрохлорида и установление его срока годности является актуальной задачей данной фармацевтической разработки.

Согласно литературным данным, нафтифина гидрохлорид обладает высокой светочувствительностью и легко разрушается при воздействии ультрафиолетовых лучей [4], поэтому его необходимо хранить в прохладном, защищенном от света месте.

Для хранения раствора на его основе, целесообразно использовать медицинские флаконы из светозащитного темного стекла. Такие флаконы отличаются прочностью, химической стойкостью и устойчивостью к световому воздействию. Для удобства и точности нанесения разработанной лекарственной формы рекомендовано использовать капельный тип дозирования. Возможно использование вертикальной крышки капельницы, которая используется как встроенное во флакон устройство дозирования жидких лекарственных средств с высокой точностью дозирования. Образование капли начинается только при перевертывании флакона с раствором в вертикальное положение. Преимущество использования крышки капельницы в том, что получаются равномерные по объему капли вне зависимости от количества раствора, остающегося во флаконе, а также имеется возможность подобрать необходимую конфигурацию капельницы к вязкости конкретной жидкости. В связи с вышесказанным для укупорки рекомендовано использовать крышки капельницы.

Объектами исследования в настоящей работе являлись образцы разработанной жидкой лекарственной формы, состоящей из нафтифина гидрохлорида, спирта этилового 96 %, полиэтиленгликоля-400 и полиэтиленгликоля-1000. Препарат хранился в рекомендуемой первичной упаковке [медицинских флаконах из светозащитного темного стекла (ТУ 9461-002-00480164-200150 мл)] по 50 мл.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение срока годности и условий хранения разработанной лекарственной формы (спиртового раствора нафтифина гидрохлорида для наружного применения) было проведено на базе кафедры аналитической, физической и коллоидной химии Института фармации им. А. П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый

МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Для определения концентрации действующего вещества в процессе хранения использовали прибор UNICO 2800 из серии сканирующих спектрофотометров UNICO 280X Spectro Quest (США) [2]. Измеряли оптическую плотность исследуемого раствора нафтифина гидрохлорида и раствора стандартного образца на УФ-спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 256 ± 2 в кварцевой кювете с толщиной слоя 10,0 мм.

Величина pH была определена с помощью иономер лабораторного типа И-160 МИ, оборудованного стандартным термодатчиком (Россия).

Вязкость образцов раствора нафтифина гидрохлорида была определена при помощи капиллярного вискозиметра Оствальда. Был использован вискозиметр ВПЖ-2 0.34 ЭКРОС (Россия) и секундомер механический Агат С ОСпр-2Б-2-000 (Россия).

Для хранения образцов раствора по методу «ускоренного старения» использовался термостат марки Bio TDB-100 (производство Biosan, Латвия).

Объектом исследования являлся раствор на основе действующего вещества нафтифина гидрохлорида (не менее 99 % основного вещества, Arcos Organic, Бельгия) (рисунок 1), спирта этилового 96 %, полиэтиленгликоля-400 и полиэтиленгликоля-1000.

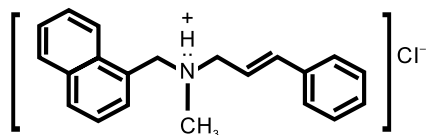


Рисунок 1. Структурная формула $C_{21}H_{21}N$, (E)-N-Метил-N-(3-фенил-2-пропенил)-1-нафталинметанамин

Figure 1. The structural formula is $C_{21}H_{21}N$, (E)-N-Methyl-N-(3-phenyl-2-propenyl)-1-naftalenemethanamine

Нафтифина гидрохлорид представляет собой белый кристаллический порошок без запаха, практически нерастворимый в воде, легко растворимый в ацетоне, растворимый в спирте 96 %. Температура плавления $171-175$ °С.

Молярная масса 323,86 г/моль.

Нафтифина гидрохлорид должен храниться в плотно закупоренной таре в защищенном от света месте.

ПЭГ-400, ПЭГ-1000

$HOCH_2-(CH_2-O-CH_2)_n-CH_2OH$, $n = 33-68$. ПЭГи производство Merck (Германия).

Полиэтиленгликоль (ПЭГ)-400 – прозрачная, вязкая жидкость, без запаха и вкуса. ПЭГ-1000 – пастообразное вещество, белого цвета, без запаха и вкуса. Плотность 1,13 г/мл. ПЭГи достаточно легко растворимы в воде, хлороформе, алифатических кетонах,

спиртах и других органических соединениях, но абсолютно нерастворимы в эфирах. Температура плавления ПЭГ-1000 $65-72$ °С. ПЭГи хранятся в хорошо закупоренной таре, прохладном и защищенном от света месте.

Спирт этиловый 95 % (х.ч.) (ГФ РФ XIV, ФС.2.1.0036.15).

Прозрачная жидкость, обладает летучими и горючими свойствами. Обладает высокой растворяющей способностью. Плотность 0,8014 г/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование было выполнено согласно ГФ РФ XIV, ОФС.1.1.0010.15 «Хранение лекарственных средств» [1].

Образцы растворов нафтифина гидрохлорида для испытаний методом ускоренного старения были заложены на хранение в термостат (температура – 40 ± 2 °С), для испытаний при пониженной температуре – в фармацевтический холодильник при температуре 8 ± 2 °С, для испытаний в естественных условиях хранились в сухом, защищенном от света месте при температуре 25 ± 2 °С. В момент изготовления раствора и в процессе хранения (каждые 3 месяца – при хранении в естественных условиях и каждые 3 месяца при хранении в условиях холодильника. Указанный срок соответствует 1 году при условии «ускоренного старения») проводили оценку качества исследуемых образцов по следующим показателям: объем содержимого упаковки, описание внешнего вида, pH, концентрация действующего вещества и вязкость препарата. Результаты анализа представлены в таблице 1.

Перед началом исследования свежеприготовленный раствор нафтифина гидрохлорида представлял собой вязкий прозрачный, бесцветный раствор, со слабым спиртовым запахом. Заявленное количественное содержание нафтифина гидрохлорида в разработанном растворе 1 %; pH $4,2 \pm 0,2$; вязкость $2,33 \cdot 10^{-2} \pm 0,1$ Па · с [3].

Внешний вид препарата на протяжении 3 месяцев изучения стабильности по методу ускоренного старения изменился от бесцветного, прозрачного до желтого (рисунок 2). Содержание наф-

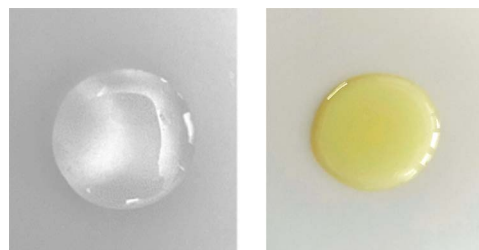


Рисунок 2. Внешний вид раствора нафтифина гидрохлорида до и после хранения методом ускоренного старения

Figure 2. Appearance of naftifine hydrochloride solution before and after storage by accelerated aging method

Таблица 1. Показатели и допустимые отклонения показателей качества раствора нафтифина гидрохлорида в процессе хранения

Table 1. Indicators and permissible deviations of the quality indicators of a solution of naphthylene hydrochloride during storage

Хранение (год)	Описание	Объем содержимого упаковки (мл)	Содержание нафтифина гидрохлорида на 50мл		Значение pH	Вязкость Па·с
			%	г		
1	2	3	4	5	6	7
Хранение методом «ускоренного старения» 40 °С						
0	Вязкий прозрачный, бесцветный раствор, со слабым спиртовым запахом	50,0	100,0 ± 3,0	0,500 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,33 · 10 ⁻²
0,25	Не соответствует, вязкий желтый раствор	40,5	65,5 ± 3,0	0,327 ± 0,015	4,0 ± 0,2	4,55 · 10 ⁻²
Естественное хранение при температуре 25 °С						
0	Вязкий прозрачный, бесцветный раствор, со слабым спиртовым запахом	50,0	100,0 ± 3,0	0,500 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,33 · 10 ⁻²
0,25	Соответствует	50,0	99,4 ± 3,0	0,490 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,31 · 10 ⁻²
0,5	Соответствует	50,0	98,8 ± 3,0	0,494 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,31 · 10 ⁻²
0,75	Соответствует	50,0	98,2 ± 3,0	0,491 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,31 · 10 ⁻²
1,0	Соответствует	49,0	97,6 ± 3,0	0,488 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,31 · 10 ⁻²
1,5	Соответствует	49,0	97,3 ± 3,0	0,486 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,31 · 10 ⁻²
2,0	Соответствует	48,5	97,0 ± 3,0	0,485 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,31 · 10 ⁻²
Естественное хранение при температуре 8 °С						
0	Вязкий прозрачный, бесцветный раствор, со слабым спиртовым запахом	50,0	100,0 ± 3,0	0,500 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,33 · 10 ⁻²
0,25	Соответствует	50,0	99,8 ± 3,0	0,499 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,41 · 10 ⁻²
0,5	Соответствует	50,0	99,6 ± 3,0	0,498 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,41 · 10 ⁻²
0,75	Соответствует	50,0	99,3 ± 3,0	0,496 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,41 · 10 ⁻²
1,0	Соответствует	50,0	99,0 ± 3,0	0,495 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,41 · 10 ⁻²
1,5	Соответствует	49,5	98,7 ± 3,0	0,493 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,41 · 10 ⁻²
2,0	Соответствует	49,0	98,4 ± 3,0	0,492 ± 0,015	4,2 ± 0,2	2,41 · 10 ⁻²

тифина гидрохлорида снизилось до 65,5 % (при норме отклонения 100 ± 3 %) и выходило за пределы допустимых значений. Вязкость препарата увеличилась в 2 раза, вероятно за счет изменений, происходящих в растворе при повышенной температуре.

Внешний вид препарата при хранении в естественных условиях при 25 °С не изменился. Раствор нафтифина гидрохлорида остался прозрачным, бесцветным, со слабым спиртовым запахом. Объем содержимого упаковки, вязкость и значение pH сохранялись в пределах установленных норм на протяжении 24 месяцев изучения стабильности. Содержание действующего вещества нафтифина гидрохлорида составило 97 % (при норме откло-

нения 100 ± 3 %) и осталось в пределах допустимых значений.

Аналогичные результаты получены и при хранении препарата в условиях холодильника при температуре 8 ± 2 °С. Объем содержимого упаковки, значение pH, содержание действующего вещества препарата остались в пределах нормы.

Следует отметить, что при температуре 8 ± 2 °С вязкость раствора повысилась и препарат приобрел очень густую консистенцию (за счет входящей в состав препарата комбинации полиэтиленгликолей) (рисунок 3), который превратился в раствор при нанесении на поврежденную ногтевую пластину (температура ногтя 32 ± 2 °С). Показатели качества препарата при этом не изменяются.

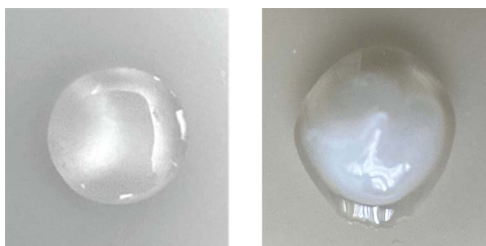


Рисунок 3. Внешний вид раствора нафтифина гидрохлорида до и после хранения в условиях холодильника (температура хранения 8 ± 2 °C)

Figure 3. Appearance of the naftifine hydrochloride solution (storage temperature 8 ± 2 °C)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено изучение стабильности антимикозной лекарственной формы – спиртового раствора нафтифина гидрохлорида. Результаты проведенного исследования показали возможность рекомендовать срок годности лекарственной формы при температуре не выше 25 °C – 2 года (также допустимо хранение в условиях холодильника при температуре 8 ± 2 °C – 2 года); первичная упаковка – медицинские флаконы из светозащитного темного стекла, обеспечивают стабильное хранение препарата на протяжении всего срока годности.

ЛИТЕРАТУРА

1. ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств» Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения. 2018.
2. ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях». Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения. 2018.
3. Патент 2699653 РФ «Средство для лечения микоза ногтей». Косенкова С. И., Краснюк И. И., Краснюк И. И. (мл), Беляцкая А. В., Степанова О. И., Фатеева Т. В. *Сеченовский Университет*. Оpubл. 09.09.2019.
4. Albini A. *Drugs Photochemistry and Photostability*. London: *Royal Society of Chemistry*. 1998.
5. Сергеев А. Ю. Системная терапия онихомикозов: пособие для врачей. 2-е изд. – М.: *Национальная академия микологии*. 2007: 34.

REFERENCES

1. OFS.1.1.0009.15 «Shelf life of medicines» State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. – Moscow: *Scientific center for examination of medical applications*. 2018 (in Russ.).
2. OFS.1.2.1.1.0003.15 «Spectrophotometry in the UV and visible regions». State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. – Moscow: *Scientific center for examination of medical applications*. 2018 (in Russ.).
3. Patent 2699653 of the Russian «Federation Remedy for the treatment of nail mycosis». Kosenkova S. I., Krasnyuk I. I., Krasnyuk I. I. (jr), Belyatskaya A. V., Stepanova O. I., Fateeva T. V. *Sechenov University*. Publ.09.09.2019 (in Russ.).
4. Albini A. *Drugs Photochemistry and Photostability*. London: *Royal Society of Chemistry*. 1998.
5. Sergeev A. Yu. *Systemic therapy of onychomycosis: a manual for doctors*. 2nd ed. – M.: *National Academy of Mycology*. 2007: 34 (in Russ.).

Интерполиэлектrolитные комплексы на основе сополимеров Eudragit® как носители для систем биоадгезивной гастроретентивной доставки метронидазола

Д. С. Гордеева¹, А. В. Ситенкова (Буховец)¹, Р. И. Мустафин^{1*}

1 – Институт фармации, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 420126, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Фатыха Амирхана, д. 16

*Контактное лицо: Мустафин Руслан Ибрагимович. E-mail: rouslan.moustafine@gmail.com

Статья получена: 11.03.2020. Статья принята к печати: 27.04.2020

Резюме

Введение. Существует ряд лекарственных веществ, зоной всасывания которых является верхняя область желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) – желудок и двенадцатиперстная кишка. Для повышения биодоступности разрабатываются гастроретентивные (внутрижелудочные) системы контролируемой доставки лекарственных веществ (ЛВ). На сегодняшний день существуют различные подходы для обеспечения внутрижелудочной доставки ЛВ. Одним из наиболее перспективных подходов является использование вспомогательных веществ, обладающих биоадгезивными свойствами, как индивидуально, так и в комбинации с другими типами гастроретентивных систем.

Цель. Разработка и исследование новых носителей для систем гастроретентивной биоадгезивной доставки лекарственных веществ на основе интерполиэлектrolитных комплексов (ИПЭК) с участием химически комплементарных поли(мет)акрилатов торговой марки Eudragit®.

Материалы и методы. Изучение набухающей способности проводилось в среде 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты (рН 1,2) при температуре 37 ± 0,5 °С в течение 6 часов. Исследование высвобождения метронидазола (МЗ) из матриц на основе соответствующих ИПЭК производилось на приборе DFZ II (ERWEKA, Германия) по методу «Проточная ячейка» в среде 0,1 М HCl, рН 1,2, скорость потока 4 мл/мин в закрытом цикле в течение 6 часов. Оценка количества высвободившегося МЗ проводилась УФ-спектрофотометрически на приборе Lambda 25 (PerkinElmer, США) при длине волны 274 нм. Адгезия ИПЭК исследовалась на анализаторе текстуры TA.XTplus (Stable Micro Systems, Великобритания).

Результаты и обсуждение. Матрицы на основе ИПЭК 1 дезинтегрировались после пребывания в среде с рН 1,2 в течение 4 часов; матрицы на основе ИПЭК 4 в течение 3 часов растворяются в кислой среде. В то же время матрицы на основе ИПЭК 2 и ИПЭК 3 сохраняют свою форму в течение всего эксперимента и характеризуются довольно высокими значениями степени набухаемости. Образцы ИПЭК характеризуются более высокой работой адгезии по сравнению с индивидуальными сополимерами. Высвобождение метронидазола из матриц на основе ИПЭК 1 происходит в соответствии с диффузией по закону Фика, из матрицы на основе ИПЭК 4 МЗ высвобождается по аномальному транспортному механизму.

Заключение. ИПЭК 3 является перспективным для использования в качестве носителя для гастроретентивных биоадгезивных систем контролируемой доставки метронидазола.

Ключевые слова: интерполиэлектrolитные комплексы, гастроретентивные системы доставки, Eudragit®, метронидазол, пероральная доставка, биоадгезия, контролируемая доставка лекарственных веществ.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Д. С. Гордеева проводила синтез образцов, оценку набухающих, биоадгезивных свойств, высвобождения и написание статьи. А. В. Ситенкова осуществляла концептуализацию исследования, а также рецензирование и корректировку статьи. Р. И. Мустафин осуществлял концептуализацию и методологию исследования, а также рецензирование и корректировку статьи. Статья была написана при участии всех соавторов. Все вышеуказанные авторы согласовали итоговую версию статьи.

Благодарность. Авторы выражают благодарность компании ERWEKA за предоставленную возможность выполнения работы на приборе «Проточная ячейка» DFZ II, а также компании Evonik Röhm GmbH за предоставление образцов сополимеров Eudragit®.

Для цитирования: Гордеева Д. С., Ситенкова (Буховец) А. В., Мустафин Р. И. Интерполиэлектrolитные комплексы на основе сополимеров Eudragit® как носители для систем биоадгезивной гастроретентивной доставки метронидазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 72–76.

Interpolyelectrolyte Complexes Based on Eudragit® Copolymers as Carriers for Bioadhesive Gastroretentive Metronidazole Delivery System

Daria S. Gordeeva¹, Aleksandra V. Sitenkova (Bukhovets)¹, Rouslan I. Moustafine^{1*}

1 – Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University, 16, Fatykh Amirhan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia

*Corresponding author: Rouslan I. Moustafine. E-mail: rouslan.moustafine@gmail.com

Received: 11.03.2020. Accepted: 27.04.2020

Abstract

Introduction. There are a number of drugs, the absorption zone of which is the upper region of the gastrointestinal tract (GIT) – the stomach and duodenum. To increase bioavailability, gastroretentive (intragastic) systems for the controlled drug delivery are being developed. To date, there are various approaches to ensure intragastric drug delivery. One of the most promising approaches is the use of excipients with bioadhesive properties, both individually and in combination with other types of gastroretentive systems.

Aim. Development and research of new carriers for gastroretentive bioadhesive drug delivery systems based on interpolyelectrolyte complexes (IPEC) with the participation of chemically complementary poly(meth)acrylates of the Eudragit®.

© Гордеева Д. С., Ситенкова (Буховец) А. В., Мустафин Р. И., 2020

© Gordeeva D. S., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Moustafine R.I., 2020

Materials and methods. The study of swelling ability was carried out in a medium of 0.1 M hydrochloric acid solution (pH 1.2) at a temperature of 37 ± 0.5 °C for 6 hours. The study of the release of metronidazole (MZ) from matrices based on the corresponding IPEC was performed on a DFZ II instrument (ERWEKA, Germany) according to the Flow Trough Cell method in 0.1 M HCl medium, pH 1.2, flow rate 4 ml/min in a closed cycle within 6 hours. The amount of released MZ was estimated by UV spectrophotometry on a Lambda 25 instrument (PerkinElmer, USA) at a wavelength of 274 nm. IPEC adhesion was studied using a TA.XTplus texture analyzer (Stable Micro Systems, UK).

Results and discussion. Matrices based on IPEC 1 were disintegrated after being in a medium with a pH of 1.2 for 4 hours, matrices based on IPEC 4 were dissolved in an acidic medium for 3 hours. At the same time, matrices based on IPEC 2 and IPEC 3 retain their shape throughout the experiment and are characterized by rather high values of the degree of swelling. IPEC samples are characterized by higher adhesion performance compared to individual copolymers. The release of metronidazole from matrices based on IPEC 1 occurs in accordance with Fick's law of diffusion; from the matrix based on IPEC 4, MZ is released according to the anomalous transport mechanism.

Conclusion. IPEC 3 is promising for use as carrier for gastroretentive bioadhesive systems of controlled delivery of metronidazole.

Keywords: interpolyelectrolyte complexes, gastroretentive drug delivery systems, Eudragit®, metronidazole, oral delivery, bioadhesion, controlled drug delivery.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Daria S. Gordeeva have carried out the synthesis of samples, evaluation of swelling ability, release and bioadhesive properties, writing – original draft. Aleksandra V. Sitenkova (Bukhovets) – conceptualization, writing – review & editing. Rouslan I. Moustafine – conceptualization, methodology, writing – review & editing. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Acknowledgment. The authors are grateful to ERWEKA for the opportunity to work on the Flow Trough Cell Apparatus DFZ II, and also to Evonik Röhm GmbH for providing samples of Eudragit® copolymers.

For citation: Gordeeva D. S., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Moustafine R. I. Interpolyelectrolyte complexes based on Eudragit® copolymers as carriers for bioadhesive gastroretentive metronidazole delivery system. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 72–76.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на стремительное развитие фармацевтической технологии и появление новых лекарственных форм, использование пероральных систем доставки активных фармацевтических ингредиентов остается одним из наиболее предпочтительных путей медикаментозной терапии. Однако биодоступность лекарственных веществ (ЛВ) во многом зависит от возможности осуществления их доставки в оптимальную зону абсорбции. Существует ряд ЛВ, зоной всасывания которых является верхняя область желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) – желудок и двенадцатиперстная кишка. Для увеличения времени пребывания ЛВ в зоне оптимальной абсорбции, а соответственно, и повышения биодоступности разрабатываются гастроретентивные (внутрижелудочные) системы контролируемой доставки лекарственных веществ. На сегодняшний день существуют различные подходы для обеспечения внутрижелудочной доставки ЛВ – плавающие системы, биоадгезивные системы, супер-пористые гидрогелевые системы, набухающие системы, системы низкой плотности, магнитные системы [1, 2]. Одним из наиболее перспективных подходов является использование вспомогательных веществ, обладающих биоадгезивными свойствами, как индивидуально, так и в комбинации с другими типами гастроретентивных систем [3, 4].

Целью настоящей работы явилась разработка и исследование новых носителей для систем гастро-ретентивной биоадгезивной доставки ЛВ на основе интерполиэлектrolитных комплексов (ИПЭК) с учас-

тием химически комплементарных поли(мет)акрилатов торговой марки Eudragit®. Ранее была доказана перспективность использования данных ИПЭК в пероральных системах с контролируемой доставкой ЛВ, относящихся к различным классам биофармацевтической классификационной системы (диклофенак натрия и теофиллин) [5, 6], а также в плавающих системах контролируемой гастроретентивной доставки метформина и ацикловира [7, 8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Eudragit® EPO (EPO) – терполимер диметиламино-этилметакрилата с метилметакрилатом и бутилметакрилатом (молярное соотношение 2:1:1), Eudragit® L 100 (L 100) – сополимер метакриловой кислоты и метилметакрилата (молярное соотношение 1:1) и Eudragit® L 100-55 (L 100-55) – сополимер акриловой кислоты и этилакрилата (молярное соотношение 1:1) были любезно предоставлены производителем Evonik Röhm GmbH (Германия). Сополимеры использовались после высушивания под вакуумом при температуре 40 °C в течение 2 дней. В качестве модельного лекарственного вещества использовали метронидазол (Sigma-Aldrich, Бельгия). Для исследования биоадгезионных свойств использовали муцин, выделенный из желудков свиней (тип II) (Sigma-Aldrich, США).

Синтез интерполиэлектrolитных комплексов на основе сополимеров Eudragit® осуществляли в водной среде по методике, описанной ранее [5]. Было получено четыре образца ИПЭК: ИПЭК 1, ИПЭК 2, ИПЭК 3 и ИПЭК 4 (таблица 1).

Таблица 1. Образцы интерполиэлектролитных комплексов на основе сополимеров Eudragit®

Table 1. The samples of interpolyelectrolyte complexes based on Eudragit® copolymers

Обозначение	Сополимеры Eudragit®	Соотношение сополимеров (моль/моль) [5, 6]
ИПЭК 1	ЕРО/L 100-55	1:2,75
ИПЭК 2	ЕРО/L 100	1:0,98
ИПЭК 3	ЕРО/L 100	1:0,67
ИПЭК 4	ЕРО/L 100	1:0,50

Изучение набухающей способности проводилось в среде, имитирующей голодный желудок, с применением 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты (рН 1,2) при температуре $37 \pm 0,5$ °С в течение 6 часов. Таблетки порошка ИПЭК массой 100 мг и диаметром 8 мм, полученные путем прессования на ручном гидравлическом прессе для ИК-спектроскопии (PerkinElmer, США) при давлении 2,45 МПа, погружали в среду объемом 40 мл. Каждые 30 минут проводилось взвешивание образцов. Степень набухания ($H_{\%}$) определяли по формуле:

$$H_{\%} = ((m_2 - m_1)/m_1) \cdot 100,$$

где m_1 – масса сухого образца; m_2 – масса набухшего образца.

Исследование высвобождения МЗ из матриц на основе соответствующих ИПЭК производилось на приборе DFZ II (ERWEKA, Германия) по методу «Проточная ячейка» в среде, имитирующей голодный желудок (0,1 М HCl; рН 1,2; $37 \pm 0,5$ °С), при скорости потока 4 мл/мин в закрытом цикле в течение 6 часов. Для этого прессовали таблетки, содержащие смесь ИПЭК и МЗ, диаметром 8 мм на ручном гидравлическом прессе для ИК-спектроскопии (PerkinElmer, США) при давлении 2,45 МПа. Оценка количества высвободивше-

гося МЗ проводилась УФ-спектрофотометрически на приборе Lambda 25 (PerkinElmer, США) при длине волны 274 нм.

Адгезия ИПЭК исследовалась на анализаторе текстуры TA.XTplus (Stable Micro Systems, Великобритания), в качестве субстрата использовали компакты муцина диаметром 13 мм, полученные путем прессования на ручном гидравлическом прессе для ИК-спектроскопии (PerkinElmer, США) при давлении 2,45 МПа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследуемых систем ранее было изучено поведение в средах, имитирующих условия различных отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [5, 6]. Для того, чтобы оценить возможность применения исследуемых ИПЭК в гастроретентивных системах контролируемой доставки ЛВ была проведена оценка набухающей способности матриц на основе данных ИПЭК в условиях, имитирующих голодный желудок (0,1 М раствор хлористоводородной кислоты, рН 1,2), в течение 6 ч. Как видно из результатов, представленных на рисунках 1 и 2, матрицы на основе ИПЭК 1 дезинтегрировались после пребывания в среде с рН 1,2 в течение 4 часов, матрицы на основе ИПЭК 4 в течение 3 часов растворяются в кислой среде. В то же время матрицы на основе ИПЭК 2 и ИПЭК 3 сохраняют свою форму в течение всего эксперимента с образованием набухающего гидрогелевого слоя и характеризуются довольно высокими значениями степени набухаемости (около 1000 %). Различное поведение матриц на основе изучаемых ИПЭК связано со структурными изменениями, происходящими во время пребывания образцов в кислой среде, что ранее было доказано в работах Р. И. Мустафина и др. [5, 6].

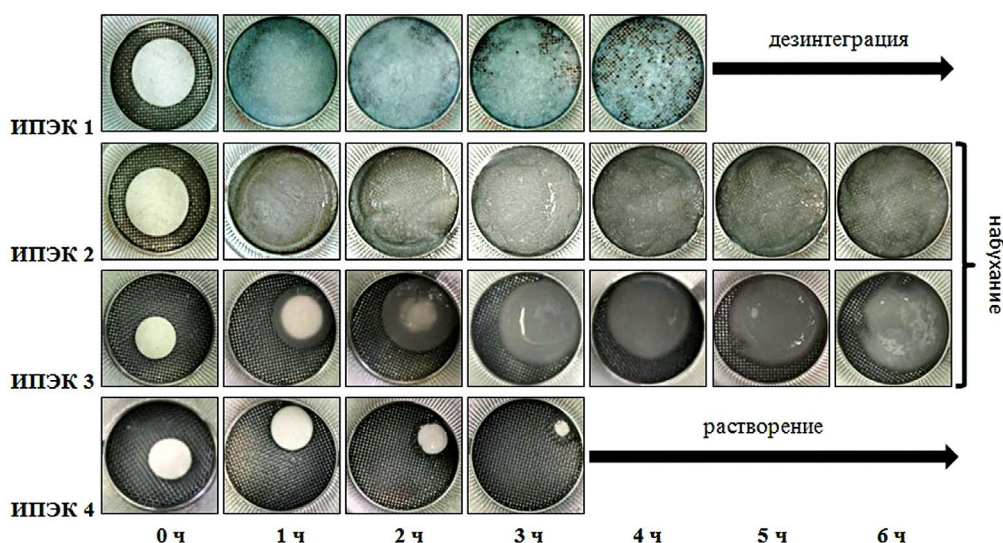


Рисунок 1. Визуальные изменения, происходящие с матрицами ИПЭК в среде, имитирующей условия голодного желудка (0,1 М HCl, рН 1,2)

Figure 1. Visible changes in the external appearance of IPEC matrices in the medium mimicking fasted stomach (0.1 M HCl, pH 1.2)

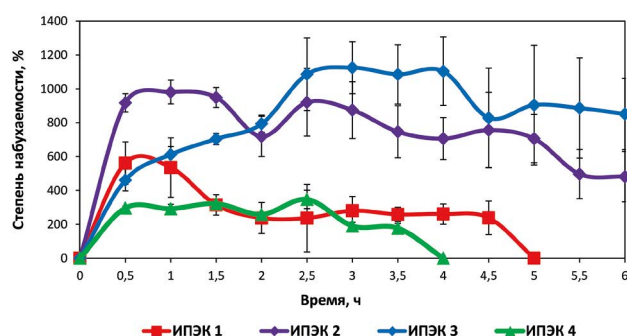


Рисунок 2. Профили поведения матриц на основе ИПЭК в среде, имитирующей условия голодного желудка (0,1 М HCl, pH 1,2)

Figure 2. IPEC matrix behavior profiles in the medium mimicking fasted stomach (0.1 M HCl, pH 1.2)

С целью предопределения возможности использования изучаемых ИПЭК в биоадгезивных гастроретентивных системах была проведена оценка биоадгезии образцов ИПЭК на компактах муцина в сравнении с индивидуальными сополимерами (таблица 2).

Таблица 2. Сравнительная характеристика биоадгезивной способности ИПЭК и индивидуальных сополимеров

Table 2. Comparative assessment of bioadhesive ability of IPEC and individual copolymers

Образец	Сила отрыва (Н)	Работа адгезии (Н)
Eudragit® EPO	0,499 ± 0,490	1,075 ± 0,040
Eudragit® L 100	0,230 ± 0,070	0,459 ± 0,170
Eudragit® L 100-55	0,607 ± 0,140	1,029 ± 0,390
ИПЭК 1	0,285 ± 0,180	2,133 ± 0,180
ИПЭК 2	0,706 ± 0,010	1,448 ± 0,120
ИПЭК 3	0,673 ± 0,234	0,708 ± 0,122
ИПЭК 4	0,744 ± 0,353	1,096 ± 0,111

Образцы ИПЭК характеризуются более высокой работой адгезии по сравнению с индивидуальными сополимерами. Как известно, в структуре муцина имеются остатки сиаловых кислот [9, 10], с которыми, предположительно, и происходит взаимодействие ИПЭК по дефектным участкам, содержащим ионизированные диметиламино группы Eudragit® EPO.

Для оценки транспортных свойств исследуемых ИПЭК в качестве модельного ЛВ использовали метронидазол, применяемый в комплексной терапии язвенной болезни желудка для эрадикации *Helicobacter pylori* [11, 12].

Профили высвобождения метронидазола из матриц на основе ИПЭК приведены на рисунке 3. Для матриц на основе ИПЭК 2 и ИПЭК 3 характерно быстрое достижение максимальной концентрации ЛВ, высвободившегося в среду растворения за короткий промежуток времени (45 % и 70 % соответственно), с последующим выходом профиля высвобождения на «плато». Следует отметить, что образцы данных ИПЭК

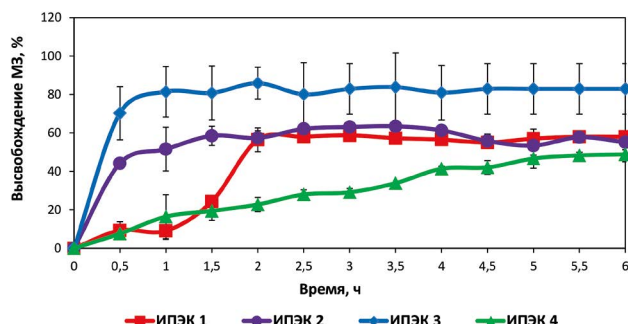


Рисунок 3. Профили высвобождения метронидазола из матриц на основе ИПЭК в среде, имитирующей условия голодного желудка (0,1 М HCl, pH 1,2)

Figure 3. Release profiles of metronidazole from IPEC matrices in the medium mimicking fasted stomach (0.1 M HCl, pH 1.2)

характеризуются наиболее высокими значениями набухающей способности (рисунок 2). Высвобождение ЛВ из матрицы на основе ИПЭК 1 происходит медленно за первый час эксперимента (не более 10 %) с последующим увеличением скорости и достижением концентрации высвободившегося вещества равной концентрации высвободившегося ЛВ из матрицы на основе ИПЭК 2. Иной профиль высвобождения МЗ обеспечивает матрица на основе образца ИПЭК 4 – происходит медленное постепенное высвобождение ЛВ во времени с достижением 50 % за 6 часов эксперимента.

Для оценки механизма, лежащего в основе процесса высвобождения МЗ из поликомплексных матриц, было проведено математическое моделирование высвобождения с использованием уравнения Korsmeyer-Perpras [13]. Результаты для образцов ИПЭК 1 и ИПЭК 4 представлены в таблице 3 (в случае образцов ИПЭК 2 и ИПЭК 3 показана низкая корреляция результатов с уравнением Korsmeyer-Perpras, данные не представлены).

Таблица 3. Результаты математического моделирования метронидазола из матриц на основе ИПЭК

Table 3. Results of mathematic modeling of metronidazole release from IPEC matrices

	ИПЭК 1	ИПЭК 4
Экспонента высвобождения	0,50 ± 0,14	0,70 ± 0,03
Константа высвобождения	27,35 ± 5,50	14,57 ± 0,74
R ²	0,8272	0,9929
Механизм высвобождения	диффузия по закону Фика	«аномальный» транспорт

Как видно, высвобождение МЗ из матриц на основе ИПЭК 1 происходит в соответствии с диффузией по закону Фика, то есть движущей силой является набухание матрицы в среде растворения, в то время как из матрицы на основе ИПЭК 4 МЗ высвобождается по аномальному транспортному механизму, когда выход

ЛВ обеспечивается не только набуханием матрицы, но и эрозией. Этим и объясняется тот факт, что профиль высвобождения из ИПЭК 4 имеет совершенно иной характер по сравнению с профилями остальных ИПЭК, а также, что, несмотря на разрушение матрицы ИПЭК 4, не нагруженной ЛВ, в среде с pH 1,2 за 4 часа, данный образец обеспечивает высвобождение МЗ в течение 6 часов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследуемые образцы ИПЭК характеризуются биоадгезивными свойствами и способностью обеспечивать пролонгированное высвобождение метронидазола в среде, имитирующей среду желудка (0,1 М раствор HCl с pH 1,2), при этом ИПЭК 3 является перспективным для использования в качестве носителя для гастроретентивных биоадгезивных систем контролируемой доставки метронидазола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Debjit B., Rishab B., Darsh G., Parshuram R., Sampath K. P. K. Gastrorretentive drug delivery systems- a novel approaches of control drug delivery systems. *Research Journal of Science and Technology*. 2018; 10(2): 145–156. DOI: 10.5958/2349-2988.2018.00022.0.
2. Pund A. U., Shandge R. S., Pote A. K. Current approaches on gastrorretentive drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2020; 10(1): 139–146. DOI: 10.22270/jddt.v10i1.3803.
3. Patil H., Tiwari R. V., Repka M. A. Recent advancements in mucoadhesive floating drug delivery systems: A mini-review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016; 31: 65–71. DOI: 10.1016/j.jddst.2015.12.002.
4. Bangun H., Aulia F., Arianto A., Nainggolan M. Preparation of mucoadhesive gastrorretentive drug delivery system of alginate beads containing turmeric extract and anti-gastric ulcer activity. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2019; 12(1): 316–320. DOI: 10.22159/ajpcr.2019.v12i1.29715.
5. Moustafine R. I., Bukhovets A. V., Sitenkov A. Y., Kemenova V. A., Rombaut P., Van den Mooter G. Eudragit® E PO as a complementary material for designing oral drug delivery systems with controlled release properties: comparative evaluation of new interpolyelectrolyte complexes with countercharged Eudragit® L 100 copolymers. *Molecular Pharmaceutics*. 2013; 10(7): 2630–2641. DOI: 10.1021/mp4000635.
6. Moustafine R. I., Bobyleva V. L., Bukhovets A. V., Garipova V. R., Kabanova T. V., Kemenova V. A., Van den Mooter G. Structural transformations during swelling of polycomplex matrices based on countercharged (meth)acrylate copolymers (Eudragit® EPO/Eudragit® L 100-55). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 100: 874–885. DOI:10.1002/jps.22320.
7. Мустафин Р. И., Протасова А. А., Буховец А. В., Семина И. И. Исследование интерполимерных сочетаний на основе (мет)акрилатов в качестве перспективных носителей в поликомплексных системах для гастроретентивной доставки. *Фармация*. 2014; 5: 3–5.
8. Мустафин Р. И., Буховец А. В., Протасова А. А., Шайхрамова Р. Н., Ситенков А. Ю., Семина И. И. Сравнительное исследование поликомплексных систем для гастроретентивной доставки метформина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015; 1(10): 48–50.
9. Харенко Е. А., Ларионова Н. И., Демина Н. Б. Мукоадгезивные лекарственные формы. *Химико-фармацевтический журнал*. 2009; 43(4): 21–29. DOI: 10.30906/0023-1134-2009-43-4-21-29.
10. Киржанова Е. А., Хуторянский В. В., Балабушевич Н. Г., Харенко А. В., Демина Н. Б. Методы анализа мукоадгезии: от фундаментальных исследований к практическому применению в разработке лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2014; 3(8): 66–80. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-27-31.
11. Youssef N. A. H. A., Kassem A. A., El-Massik M. A. E., Boraie N. A. Development of gastrorretentive metronidazole floating raft system for targeting *Helicobacter pylori*. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015; 486: 297–305. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.004.
12. Farshforoush P., Ghanbarzadeh S., Goganian A. M., Hamishehkar H. Novel metronidazole-loaded hydrogels as a gastrorretentive drug delivery system. *Iranian Polymer Journal*. 2017; 26: 895–901. DOI: 10.1007/s13726-017-0575-4.
13. Korsmeyer R. W., Gurny R., Docler E., Buri P., Peppas N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1983; 15: 25–35. DOI:10.1016/0378-5173(83)90064-9.

REFERENCES

1. Debjit B., Rishab B., Darsh G., Parshuram R., Sampath K. P. K. Gastrorretentive drug delivery systems- a novel approaches of control drug delivery systems. *Research Journal of Science and Technology*. 2018; 10(2): 145–156. DOI: 10.5958/2349-2988.2018.00022.0.
2. Pund A. U., Shandge R. S., Pote A. K. Current approaches on gastrorretentive drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2020; 10(1): 139–146. DOI: 10.22270/jddt.v10i1.3803.
3. Patil H., Tiwari R. V., Repka M. A. Recent advancements in mucoadhesive floating drug delivery systems: A mini-review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016; 31: 65–71. DOI: 10.1016/j.jddst.2015.12.002.
4. Bangun H., Aulia F., Arianto A., Nainggolan M. Preparation of mucoadhesive gastrorretentive drug delivery system of alginate beads containing turmeric extract and anti-gastric ulcer activity. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2019; 12(1): 316–320. DOI: 10.22159/ajpcr.2019.v12i1.29715.
5. Moustafine R. I., Bukhovets A. V., Sitenkov A. Y., Kemenova V. A., Rombaut P., Van den Mooter G. Eudragit® E PO as a complementary material for designing oral drug delivery systems with controlled release properties: comparative evaluation of new interpolyelectrolyte complexes with countercharged Eudragit® L 100 copolymers. *Molecular Pharmaceutics*. 2013; 10(7): 2630–2641. DOI: 10.1021/mp4000635.
6. Moustafine R. I., Bobyleva V. L., Bukhovets A. V., Garipova V. R., Kabanova T. V., Kemenova V. A., Van den Mooter G. Structural transformations during swelling of polycomplex matrices based on countercharged (meth)acrylate copolymers (Eudragit® EPO/Eudragit® L 100-55). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 100: 874–885. DOI:10.1002/jps.22320.
7. Mustafin R. I., Protasova A. A., Bukhovets A. V., Semina I. I. Investigation of interpolymers based on (meth)acrylates as promising carriers in multiplex gastrorretentive drug delivery systems. *Farmatsiya*. 2014; 5: 3–5 (in Russ.).
8. Moustafine R. I., Bukhovets A. V., Protasova A. A., Shaykhranova R. N., Sitenkov A. Y., Semina I. I. Comparative investigation of polycomplex systems for gastrorretentive metformin delivery. *Drug development & registration*. 2015; 1(10): 48–50 (in Russ.).
9. Kharenko E. A., Larionova N. I., Demina N. B. Mucoadhesive drug delivery systems (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2009; 43(4): 21–29 DOI: 10.30906/0023-1134-2009-43-4-21-29 (in Russ.).
10. Kirzhanova E. A., Khutoryanskiy V. V., Balabushevich N. G., Kharenko A. V., Demina N. B. Methods for analysis of mucoadhesion: from basic research to practical applications in dosage forms development. *Drug development & registration*. 2019; 8(4): 27–31. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-27-31 (in Russ.).
11. Youssef N. A. H. A., Kassem A. A., El-Massik M. A. E., Boraie N. A. Development of gastrorretentive metronidazole floating raft system for targeting *Helicobacter pylori*. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015; 486: 297–305. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.004.
12. Farshforoush P., Ghanbarzadeh S., Goganian A. M., Hamishehkar H. Novel metronidazole-loaded hydrogels as a gastrorretentive drug delivery system. *Iranian Polymer Journal*. 2017; 26: 895–901. DOI: 10.1007/s13726-017-0575-4.
13. Korsmeyer R. W., Gurny R., Docler E., Buri P., Peppas N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1983; 15: 25–35. DOI:10.1016/0378-5173(83)90064-9.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-77-81>
УДК 615.451.16



Оригинальная статья/Research article

Кинетика экстрагирования диосцина из растительного сырья в виброкавитационном гомогенизаторе

Е. В. Флисюк¹, С. С. Белокуров¹, И. А. Наркевич¹, А. Н. Шиков¹, О. М. Флисюк², Д. Ю. Ивкин^{1*}

¹ – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

² – Санкт-Петербургский государственный техникум (технический университет) (СПбГТИ (ТУ)), 190013, Россия, г. Санкт-Петербург, Московский проспект, д. 26

*Контактное лицо: Ивкин Дмитрий Юрьевич. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Статья получена: 03.04.2020. Статья принята к печати: 15.05.2020

Резюме

Введение. В последние годы вещества, извлекаемые из растительного сырья, находят самое широкое применение в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности. Такие вещества используются в качестве растворов, сухих экстрактов для изготовления лекарственных препаратов, БАДов, косметических кремов, пищевых добавок в различных видах – таблеток, капсул, растворов, гранулированных порошков. Извлечения ценных веществ из растительного сырья производится с помощью процесса экстрагирования, который осуществляется различными методами и в аппаратах различной конструкции. Ранее было проведено сравнительное исследование экстрагирования диосцина из пажитника сеного различными методами: в аппаратах с мешалкой; в ультразвуковом поле; сверхкритической, флюидной CO₂ экстракцией и в виброкавитационном гомогенизаторе. Показано, что наиболее эффективным методом является экстрагирование, осуществляемое в виброкавитационном гомогенизаторе.

Цель. Целью данной работы является изучение экстрагирования в виброкавитационном гомогенизаторе для определения коэффициентов массоотдачи как внешней диффузии, так и внутри частицы для оценки длительности процесса экстрагирования при заданной степени извлечения диосцина.

Материалы и методы. Экспериментальное изучение извлечения ценных компонентов из растительного сырья проводилось на лабораторной установке с виброкавитационным гомогенизатором периодического действия. В качестве сырья были использованы семена пажитника сеного, экотип Марокко, приобретенных в фирме Фитокаса г. Касабланка (Марокко). Товароведческий анализ показал соответствие сырья требованиям ГФ XIV издания. В качестве экстрагентов использовали водные растворы этанола с концентрацией спирта 40, 50, 60, 70, 80 и 90 %. В основу анализа кинетики процесса легли известные представления о механизме массопереноса, принятые в теории экстрагирования.

Результаты и обсуждение. Анализ полученных результатов показывает, что скорость вращения ротора значительно интенсифицирует процесс. Кроме того, влияние скорости вращения ротора наиболее существенно проявляется на начальном этапе процесса, когда экстрагированию подвергаются поверхностные слои частиц растительного сырья. Так же было установлено, что сопротивление массопереносу внутри частиц существенно возрастает по мере приближения к завершающей стадии процесса, а с повышением частоты вращения ротора, увеличивается, особенно на начальной стадии процесса, что связано с интенсивностью кавитации и ослабления ее воздействия по мере углубления процесса во внутрь частиц.

Заключение. Полученные зависимости необходимы для определения продолжительности процесса экстрагирования в периодическом режиме или среднего времени пребывания семян в рабочем объеме при организации процесса в непрерывном режиме.

Ключевые слова: диосцин, пажитник, водно-спиртовой раствор, смешанная кинетика, коэффициенты массоотдачи.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы Е. В. Флисюк, С. С. Белокуров, И. А. Наркевич, О. М. Флисюк, А. Н. Шиков и Д. Ю. Ивкин придумали и разработали эксперимент. С. С. Белокуров провел эксперимент по экстрагированию и определению содержания сапонинов. Авторы С. С. Белокуров, Е. В. Флисюк и О. М. Флисюк участвовали в обработке данных. Авторы С. С. Белокуров, Е. В. Флисюк и О. М. Флисюк участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Флисюк Е. В., Белокуров С. С., Наркевич И. А., Шиков А. Н., Флисюк О. М., Ивкин Д. Ю. Кинетика экстрагирования диосцина из растительного сырья в виброкавитационном гомогенизаторе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 77–81.

Kinetics of Extraction of Dioscine from Vegetable Raw Materials in Vibrocavitation Homogenizer

Elena V. Flisyuk¹, Sergey S. Belokurov¹, Igor A. Narkevich¹, Alexander N. Shikov¹, Oleg M. Flisyuk², Dmitry Yu. Ivkin^{1*}

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

² – Saint-Petersburg State Institute of Technology (Technical University), 26, Moskovsky Prospect, Saint-Petersburg, 190013, Russia

*Corresponding author: Dmitry Y. Ivkin. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Received: 03.04.2020. Accepted: 15.05.2020

Abstract

Introduction. In recent years, substances extracted from plant materials have been widely used in the pharmaceutical, cosmetic and food industries. Such substances are used as solutions, dry extracts for the manufacture of medicines, dietary supplements, cosmetic creams, food additives in various forms – tablets, capsules, solutions, granular powders. The extraction of valuable substances from plant materials is carried out using the extraction process, which is carried out by various methods and in apparatuses of various designs. Earlier, a comparative study of the extraction of dioscin from fenugreek by various methods was carried out: in devices with a stirrer, in an ultrasonic field, supercritical, fluid CO₂ extraction, and in a vibro-cavitation homogenizer. It is shown that the most effective method is the extraction carried out in a vibrocavitation homogenizer.

© Флисюк Е. В., Белокуров С. С., Наркевич И. А., Шиков А. Н., Флисюк О. М., Ивкин Д. Ю., 2020

© Flisyuk E. V., Belokurov S. S., Narkevich I. A., Shikov A. N., Flisyuk O. M., Ivkin D. Yu., 2020

Aim. To analyze the kinetics of the extraction of dioscin from fenugreek seeds, to determine the optimal values of the required degree of grinding of the raw materials, working temperature, the concentration of ethyl alcohol in the solution and the rotational speed of the rotor of the vibrocavitation homogenizer. Determine the effective mass transfer coefficient responsible for the intensity of mass transfer inside the particles.

Materials and methods. An experimental study of the extraction of valuable components from plant materials was carried out in a laboratory unit with a vibrocavitation homogenizer of periodic action. As raw materials were used seeds of hay fenugreek, ecotype of Morocco, acquired in the company Fitokasa, Casablanca (Morocco), which we used for research. Commodity analysis showed that raw materials comply with the requirements of the State Pharmacopoeia XIVth edition. As extractants, aqueous solutions of ethanol with an alcohol concentration of 40, 50, 60, 70, 80, and 90 %. The analysis of the kinetics of the process was based on the following ideas. Extraction begins with the surface of the particles of plant material. As the extracted component moves into the volume of the solution, the extractant penetrates into the internal pores of the particles, and the surface on which the extractant and the extracted component interact is gradually shifted into the individual particles. In this case, the resistance to mass transfer in the region between the specified surface and the outer surface of the particle increases over time.

Results and discussion. An analysis of the results shows that the rotor speed significantly intensifies the process. In addition, the influence of the rotor speed is most pronounced at the initial stage of the process, when the surface layers of particles of plant material are extracted. It was also found that the resistance to mass transfer inside particles increases significantly as it approaches the final stage of the process, and with an increase in the rotor speed, it increases, especially at the initial stage of the process, which is associated with the intensity of cavitation and the weakening of its effect as the process deepens inward particles.

Conclusions. The obtained dependences are necessary to determine the duration of the extraction process in a batch mode, or the average residence time of seeds in the working volume when organizing the process in a continuous mode.

Keywords: dioscin, fenugreek, water-alcohol solution, combined kinetics, mass transfer coefficients.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Authors Elena V. Flisyuk, Sergey S. Belokurov, Igor A. Narkevich, Oleg M. Flisyuk, Alexander N. Shikov and Dmitry Yu. Ivkin invented and developed an experiment. Sergey S. Belokurov conducted an experiment to extract and determine the content of saponins. Authors Sergey S. Belokurov and Elena V. Flisyuk and Oleg M. Flisyuk participated in data processing. Authors Sergey S. Belokurov, Elena V. Flisyuk, Oleg M. Flisyuk participated in the writing of the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Flisyuk E. V., Belokurov S. S., Narkevich I. A., Shikov A. N., Flisyuk O. M., Ivkin D. Yu. Kinetics of extraction of dioscin from vegetable raw materials in vibrocavitation homogenizer. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 77–81.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы вещества, извлекаемые из растительного сырья, находят самое широкое применение в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности. Такие вещества используются в качестве растворов, сухих экстрактов для изготовления лекарственных препаратов, БАДов, косметических кремов, пищевых добавок в различных видах – таблеток, капсул, растворов, гранулированных порошков.

Извлечения ценных веществ из растительного сырья производится с помощью процесса экстрагирования, который осуществляется различными методами и в аппаратах различной конструкции. Ранее [1] было проведено сравнительное исследование экстрагирования диосцина из пажитника сенного различными методами: в аппаратах с мешалкой; в ультразвуковом поле; сверхкритической, флюидной CO₂ экстракцией и в виброкавитационном гомогенизаторе. Показано, что наиболее эффективным методом является экстрагирование, осуществляемое в виброкавитационном гомогенизаторе.

Объектом нашего исследования были выбраны извлечения из семян пажитника сенного (лат. *Trigonella foenum-graecum* сем. *Fabaceae*), полученные различными методами экстракции. Семена пажитника сенного часто использовались в лечебных целях как ветрогонное, слабительное, отхаркивающее средство и применялись для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта. Отвары из семян пажитника применяли при повышении температуры тела, боли в

горле, при ранах и язвах, опухание желез, раздражение кожи, бронхите и диабете.

Целью данной работы является изучение экстрагирования в виброкавитационном гомогенизаторе для определения коэффициентов массоотдачи как внешней диффузии, так и внутри частицы для оценки длительности процесса экстрагирования при заданной степени извлечения диосцина.

Для создания кавитации в жидкости необходимо создать растягивающие напряжения, которые могут вызвать локальные разрывы ее сплошности.

Присутствие в жидкости твердых частиц может служить ядром возникновения кавитации, что существенно интенсифицирует процесс экстрагирования в таком аппарате.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное изучение извлечения ценных компонентов из растительного сырья проводилось на лабораторной установке с виброкавитационным гомогенизатором периодического действия. На данном аппарате изучали процесс экстрагирования и набирали опытные партии продукта. В качестве сырья использованы семена пажитника сенного, экотип Марокко, приобретенных в фирме Фитокаса г. Касабланка (Марокко). Товароведческий анализ показал соответствие сырья требованиям ГФ XIV издания [10]. В качестве экстрагентов использовали водные растворы этанола с концентрацией спирта 40, 50, 60, 70, 80 и 90 %.

Виброкавитационный гомогенизатор представляет лабораторный образец аппарата, изготовленного в СПбГТИ (ТУ), состоящий из статора и ротора, вращающегося с высокой скоростью [3, 4].

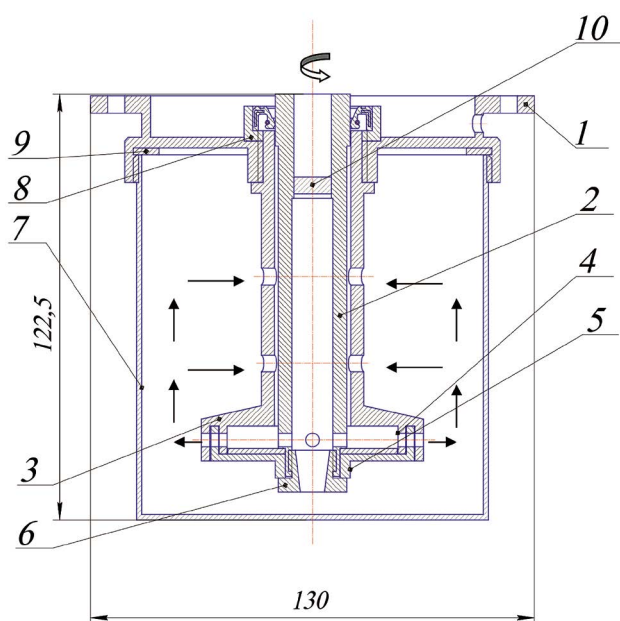


Рисунок 1. Схема виброкавитационного гомогенизатора:

1 – крышка; 2 – втулка; 3 – статор; 4 – крыльчатка; 5 – ротор; 6 – нижняя втулка; 7 – стакан; 8 – втулка сальниковая; 9 – прокладка; 10 – заглушка

Figure 1. Scheme of vibrocavitation homogenizer:

1 – cover; 2 – sleeve; 3 – stator; 4 – impeller; 5 – rotor; 6 – lower sleeve; 7 – a glass; 8 – stuffing box; 9 – gasket; 10 – stub

Работа аппарата осуществляется следующим образом.

Суспензия, представляющее собой смесь экстрагента с предварительно неизмельченными семенами пажитника сенного размером 1–2 мм и предварительно подогретая до температуры 60 °С, загружалась в стакан 7, в количестве 0,2 литра, затем включался электродвигатель и сырье обрабатывалось при заданной частоте вращения, а пробы для анализа отбирались через каждые 10 минут. В течение опыта разогрев обрабатываемого сырья составлял несколько градусов, поэтому не оказывал существенного влияния на изменение вязкости среды. Каждый опыт проводился в течение 60 минут. Результаты опытов представлены на рисунках 2–5. В процессе экстрагирования происходило измельчение семян до среднего размера порядка 130 мкм. Причем этот размер достигался достаточно быстро – в течение 5–10 минут и затем практически не изменялся во времени всего опыта. Очевидно, что это связано с постоянством зазора между статором и ротором виброкавитационного гомогенизатора. Необходимо отметить, что при экстрагировании другими методами – в аппаратах с мешалкой; с использованием

ультразвука и низкотемпературной CO_2 – экстракцией [1] дисперсный состав семян пажитника также подвергался измельчению и средний размер частиц во всех опытах был близким к указанному. Это позволяет проводить сравнение различных методов экстрагирования по эффективности друг с другом. Кроме того, результаты эксперимента показали, что наибольший выход целевого компонента (диосцина) был при концентрации этанола в растворе 60 %, поэтому дальнейший анализ проводился по результатам опытов с этой концентрацией этанола в растворе.

В основу анализа кинетики процесса легли следующие далее представления [5]. Экстрагирование начинается с поверхности частиц растительного сырья. По мере перехода в объем раствора экстрагированного компонента экстрагент проникает во внутренние поры частиц, и поверхность, на которой происходит взаимодействие экстрагента извлекаемого компонента, постепенно смещается внутрь отдельной частицы. При этом сопротивление массопереносу в области между указанной поверхностью и наружной поверхностью частицы с течением времени возрастают. Если через $\beta_s(t)$ обозначить эффективный коэффициент массоотдачи через эту область, то поток экстрагируемого компонента $j(t)$, отнесенный к единице поверхности частицы, может быть выражен с помощью уравнения массоотдачи:

$$j(t) = \beta_s(t)[C_n - C_{rp}(t)], \quad (1)$$

где C_n – концентрация извлекаемого компонента у поверхности взаимодействия реагентов, равная концентрации насыщенного раствора; C_{rp} – концентрация извлекаемого компонента на поверхности частицы. Тот же удельный массовый поток $j(t)$ может быть выражен через уравнение массоотдачи, записанное для внешнего диффузионного пограничного слоя частицы:

$$j(t) = \beta_n[C_{rp}(t) - C(t)]. \quad (2)$$

Здесь β_n – коэффициент массоотдачи от поверхности частицы в объем раствора, зависящий только от гидродинамических условий в аппарате; $C(t)$ – концентрация извлекаемого компонента в объеме раствора. Исключая из соотношений (1) и (2) концентрацию на границе $C_{rp}(t)$ для удельного потока имеем:

$$j(t) = \frac{C_n - C(t)}{\frac{1}{\beta_s(t)} + \frac{1}{\beta_n}}. \quad (3)$$

Отсюда видно, что скорость экстрагирования убывает с течением времени как за счет уменьшения движущей силы массопередачи, так и за счет увеличения диффузионного сопротивления внутри частицы. Именно массоперенос внутри частицы, в конечном счете, определяет продолжительность процесса экстрагирования при заданной степени извлечения.

Величина удельного потока $j(t)$ может быть выражена также через скорость изменения концентрации $C(t)$ в объеме суспензии:

$$j(t) = \frac{V}{S} \frac{dC(t)}{dt}, \quad (4)$$

где S – суммарная поверхность всех частиц в суспензии; V – ее объем. Из (3) и (4) вытекает соотношение для коэффициента массоотдачи $\beta_b(t)$ [6]:

$$\beta_b(t) = \left[\frac{C_n - C(t)}{\frac{V}{S} \frac{dC(t)}{dt}} - \frac{1}{\beta_n} \right]^{-1}. \quad (5)$$

Из полученного соотношения следует, что о внутри диффузионной кинетике процесса экстрагирования, которая характеризуется коэффициентом $\beta_b(t)$, можно однозначно судить исходя из поведения кинетической кривой $C(t)$.

На рисунке 2 приведены экспериментальные кривые, иллюстрирующие зависимость концентрации диосцина $C(t)$ от времени в растворе при различной частоте вращения ротора. Эти кинетические зависимости непосредственно используются для расчета коэффициента массоотдачи $\beta_b(t)$ по соотношению (5).

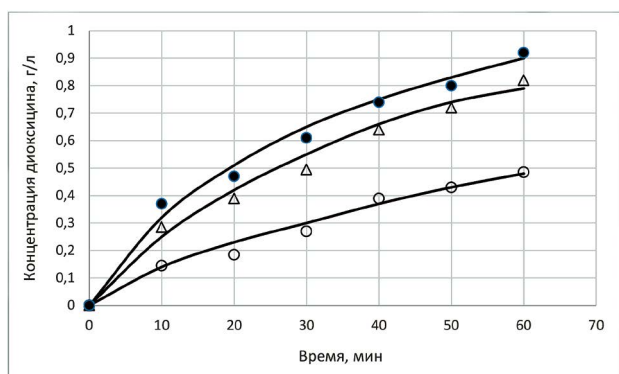


Рисунок 2. Зависимость от времени концентрации диосцина в 60 % растворе этанола при различной частоте вращения ротора:

○ – $n = 1000$ об/мин; Δ – $n = 3000$ об/мин; ● – $n = 5000$ об/мин

Figure 2. Time-dependent concentration of dioscin in a 60 % ethanol solution at different rotor speeds:

○ – $n = 1000$ rpm; Δ – $n = 3000$ rpm; ● – $n = 5000$ rpm

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных результатов показывает, что скорость вращения ротора значительно интенсифицирует процесс. Кроме того, влияние скорости вращения ротора наиболее существенно проявляется на начальном этапе процесса, когда экстрагированию подвергаются поверхностные слои частиц растительного сырья.

По известной зависимости $C(t)$, используя соотношение (5), можно количественно оценить уменьшение интенсивности экстрагирования по мере протекания процесса. Предварительно была определена концентрация насыщенного раствора диосцина при рабочей температуре, она составила 100 г/л. Кроме того, для расчета необходимо определить суммарную поверхность частиц и коэффициент массоотдачи через внешний диффузионный слой.

Учитывая, что в аппарате такого типа имеет место образование интенсивных турбулентных пульсаций, то для расчета коэффициента внешней массоотдачи использовалась известная критериальная зависимость β_n от плотности диссипации энергии в перемешиваемой массе суспензии [7]:

$$\beta_n = 0,267(\epsilon_{o6}v)^{0,25}P_r^{-0,75}, \quad (6)$$

где $\epsilon_{o6} = N/(\rho_c V)$; N – мощность, затрачиваемая на измельчение и перемешивание суспензии (значение N определялось в процессе эксперимента с помощью преобразователя частоты); ρ_c – плотность суспензии; V – объем суспензии (в опытах он не изменялся и был 0,2 л); v – коэффициент кинематической вязкости суспензии; $P_r = v/D$ – критерий Прандтля; D – коэффициент молекулярной диффузии диосцина, определялся расчетным путем [8] и составил $2,39 \cdot 10^{-8}$ м²/с. Величина коэффициента β_n при частотах вращения ротора 1000, 3000 и 5000 об/мин, рассчитанная по выражению (6), составила соответственно $2,14 \cdot 10^{-3}$, $2,33 \cdot 10^{-3}$ и $2,61 \cdot 10^{-3}$ м/с.

Для определения суммарной поверхности частиц, участвующей в опытах, проведен анализ дисперсного состава шрота. В результате статистического анализа, полученного распределения частиц, был определен средний размер частиц (как математическое ожидание случайной величины), который составил 0,13 мм.

Средняя поверхность одной частицы связана соответственно со вторым моментом случайной величины d [9]. В опытах использовалась навеска семян массой $M = 10$ г при объеме суспензии $V = 0,2$ л. Истинная плотность шрота (измельченных семян) 1,21 г/см³. С учетом приведенных значений суммарная поверхность частиц в суспензии S составила 0,331 м². Наконец, концентрация насыщенного раствора диосцина при температуре 60 °С равна 100 г/л. Расчет по соотношению (5) с использованием всех выше перечисленных значений позволил количественно оценить поведение эффективного коэффициента внутренней массоотдачи $\beta_b(t)$ в зависимости от времени выщелачивания при различной частоте вращения ротора. Рисунок 3 иллюстрирует указанные зависимости. Анализ этих результатов показывает, что сопротивление массопереносу внутри частиц существенно возрастает по мере приближения к завершающей стадии процесса, а с повышением частоты вращения ротора, увеличивается, особенно на начальной стадии процесса, что

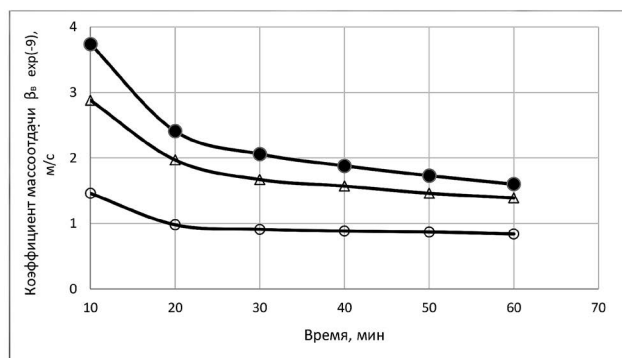


Рисунок 3. Зависимость эффективного коэффициента массоотдачи внутри частицы от времени экстрагирования диосцина в 60 % растворе этанола при различной частоте вращения ротора:

○ – $n = 1000$ об/мин; Δ – $n = 3000$ об/мин; ● – $n = 5000$ об/мин

Figure 3. The dependence of the effective mass transfer coefficient inside the particle on the time of extraction of dioscin in a 60 % ethanol solution at different rotor speeds:

○ – $n = 1000$ rpm; Δ – $n = 3000$ rpm; ● – $n = 5000$ rpm

связано с интенсивностью кавитации и ослабления ее воздействия по мере углубления процесса во внутрь частиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные зависимости необходимы для определения продолжительности процесса экстрагирования в периодическом режиме или среднего времени пребывания семян в рабочем объеме при организации процесса в непрерывном режиме. Кроме того, с их помощью может быть установлена целесообразная степень извлечения диосцина из семян пажитника. Отметим также, что изложенный подход может быть применен при изучении кинетики экстрагирования ценных компонентов из любого растительного сырья при условии, что кинетика извлечения носит внутри диффузионный или смешанный характер.

ЛИТЕРАТУРА

- Белокуров С. С., Флисюк Е. В., Наркевич И. А., Лужанин В. Г., Шилов С. В., Новикова К. О. Сравнительный анализ перспективных методов экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сеного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 47–53.
- Фролов В. Ф., Флисюк О. М. Процессы и аппараты химической технологии. *СИНТЕЗ*. 2008: 468.
- Пименов Ю. А. Виброкavitационный смеситель-гомогенизатор пат. – 2131761 Рос. Федерация; рег. № 98105553/25; заявл. 25.03.1998; опубл. 20.06.1999.
- Лисицын Н. В., Лебедской-Тамбиев М. А., Флисюк О. М. Экспериментальное исследование получения водоземulsionного топлива на основе нефтесодержащих отходов. *Известия СПбГТИ (ТУ)*. 2014; 27(53): 56–58.
- Романков П. Г., Курочкина М. И. Экстрагирование из твердых материалов. *Химия*. 1983: 256.
- Флисюк О. М., Марцулевич Н. А., Круковский О. Н., Марков А. С., Гришин В. В. Кинетика кислотного выщелачивания марганцевой руды Тыннинского месторождения. *Известия СПбГТИ (ТУ)*. 2017; 41(67): 94–97.

- Романков П. Г., Фролов В. Ф., Флисюк О. М. Массообменные процессы химической технологии. *ХИМИЗДАТ*. 2011: 440.
- Романков П. Г., Фролов В. Ф., Флисюк О. М. Методы расчета процессов и аппаратов химической технологии. *ХИМИЗДАТ*. 2009: 543.
- Тихонов А. Н., Уфимцев М. В. Статистическая обработка результатов экспериментов. *Изд-во МГУ*. 1988: 174.
- Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. – М.: МЗРФ. 2018: 7019.

REFERENCES

- Belokurov S. S., Flisyuk E. V., Narkevich I. A., Lujanin V. G., Shilov S. V., Novikova K. O. Comparative analysis of promising extraction methods for obtaining extracts from hay fenugreek seeds. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 47–53 (in Russ.).
- Frolov V. F., Flisyuk O. M. Processes and devices of chemical technology. *SYNTHESIS*. 2008: 468 (in Russ.).
- Pimenov Yu. A. Vibro-cavitation mixer-homogenizer: Pat. – 2131761 Rus. Federation; reg. No. 98105553.25; declared 03.25.1998; publ. 06.20.1999 (in Russ.).
- Lisitsyn N. V., Lebedskoy-Tambiev M. A., Flisyuk O. M. An experimental study of the production of aqueous emulsion fuels based on oily waste. *Proceedings of SPBGTI (TU)*. 2014; 27(53): 56–58 (in Russ.).
- Romankov P. G., Kurochkina M. I. Extraction from solid materials. *Chemistry*. 1983: 256 (in Russ.).
- Flisyuk O. M., Martsulevich N. A., Krukovsky O. N., Markov A. S., Grishin V. V. Kinetics of acid leaching of manganese ore of Tyninsky deposit. *Proceedings of SPBGTI (TU)*. 2017; 41(67): 94–97 (in Russ.).
- Romankov P. G., Frolov V. F., Flisyuk O. M. Mass transfer processes of chemical technology. *HIMIZDAT*. 2011: 440. (in Russ.).
- Romankov P. G., Frolov V. F., Flisyuk O. M. Methods for calculating processes and apparatuses of chemical technology. *HIMIZDAT*. 2009: 543. (in Russ.).
- Tikhonov A. N., Ufimtsev M. V. Statistical processing of experimental results. *Publishing house MGU*. 1988: 174. (in Russ.).
- State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed. V. 2. – M.: MZRF. 2018: 7019. (in Russ.).

СПЕЦПРЕДЛОЖЕНИЯ ОТ ХИММЕД!

**СУПЕРЦЕНЫ на полимерные фазы
для твердофазной экстракции:
CHROMABOND® HLB
и CHROMABOND® HR-Xperts**

Скачать
прайс



**Картриджи и расходные материалы на
системы очистки воды Merck Millipore
СО СКЛАДА В МОСКВЕ
ПО ПРИВЛЕКАТЕЛЬНЫМ ЦЕНАМ !!!**



Система(*)	Наименование	Каталожный номер	Цена, евро
SIMPLICITY	Картридж очистки воды Simplipak	SIPKoSIA1	310,00
	Финишный фильтр для системы Симплисити	SIMFILTER	195,96
	Вент-Фильтр Millex (10 шт./уп.)	SLFH02510	165,34
	УФ-лампа UV LAMP 185 nm	SYN185UV1	499,23
	Финишный ультрафильтр BIOPAK	CDUFBlo01	469,10
Elix Essential, Elix Advantage	Картридж PROGARD 2 ALONE (LONG)	PRoGo0002	408,95
	Картридж предочистки Progard 2	PRoGoToS2	461,37
	Вентфильтр для Резервуара 30/60/100л.	TANKMPK01	165,67
	Таблетки для санитизации мембраны обратного осмоса	ZWCL01F50	103,00
Direct-Q 3,5,8	Картридж SMARTPAK DQ3	SPR00SIA1	655,36
Milli-Q	Картридж предочистки Progard 3	PRoGo000T3	434,78
Direct 8,16	Картридж очистки воды Q-PAK TEX	QPAK00TEX	464,37
Milli-Q A10, Milli-Q Integral	Картридж QUANTUM EX	QTUM0000EX	571,50
	Картридж очистки воды QUANTUM EX (Органекс)	QTUM00TEX1	450,88
	Финишный фильтр MILLIPAK 40 0.22um, 2 шт./уп.	MPGL04GK2	294,50
	Картридж Q-GARD T1 PACK (1/PK)	QGARDT1X1	513,80
	УФ-лампа для ТОС-монитора A10	ZFA10UVM1	850,00
	УФ-лампа для системы Milli-Q	ZMQUVLP01	720,00

*деление имеет условный характер, один и тот же элемент может быть использован с разными системами.
Совместимость тех или иных расходных материалов уточняйте у менеджеров отдела продаж.

SEPPIC

ЗАГУСТИТЕЛИ ДЛЯ АНТИСЕПТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ



Компания «ХИММЕД» предлагает загустители линейки SEPINEO™ от компании SEPPIC (Франция) для производства водно-спиртовых антисептических средств для дезинфекции рук и предметов обихода. Два уникальных загустителя SEPINEO™ P 600 и SEPINEO™ D.E.R.M. являются лучшим выбором в сложившейся ситуации, ведь благодаря им:

- нейтрализация и расчет ГЛБ не требуются;
- для производства достаточно комнатной температуры и обычной мешалки;
- возможность работать с широким выбором растворителей и при pH от 3 до 12;
- значительно сокращаются затраты времени и ресурсов на производство;
- процесс легко воспроизводимый, достаточно приготовить один раз;
- улучшается текстура и внешний вид готового продукта.

С помощью SEPINEO™ возможно получить все виды мягких форм: спреи, мази, пенки и т.д.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-83-90>
УДК 615.03



Оригинальная статья/Research article

Поликомплексный носитель для трансбуккальной мукоадгезивной доставки метронидазола

Р. И. Мустафин^{1*}, В. В. Будников², С. Г. Абдуллина¹, Ш. Ф. Насибуллин¹, Р. А. Салеев²

¹ – Институт фармации, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 420126, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Фатыха Амирхана, д. 16

² – ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (КГМУ), кафедра ортопедической стоматологии, 420012, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 16

*Контактное лицо: Мустафин Руслан Ибрагимович. E-mail: rouslan.moustafine@gmail.com

Статья получена: 17.04.2020. Статья принята к печати: 21.05.2020

Резюме

Введение. Одним из требований, предъявляемых к трансбуккальным системам доставки лекарственных веществ (ЛВ), является проявление мукоадгезивных свойств носителя, обеспечивающего удерживание на слизистой продолжительное время с постепенным высвобождением включенного ЛВ. Следует отметить, что одним из преимуществ буккальных систем по сравнению с пероральными, является отсутствие эффекта «первого прохождения» через печень.

Цель. Провести физико-химическое и фармацевтическое исследование интерполиэлектролитного комплекса (ИПЭК), полученного на основе полимеров фармацевтического назначения Eudragit® EPO и Noveon® AA-1, в сравнении с физической смесью и индивидуальными полимерами, в качестве мукоадгезивной системы доставки метронидазола для лечения заболеваний рта.

Материалы и методы. Полученные на основе пары полимеров фармацевтического назначения (Eudragit® EPO и Noveon® AA-1) два образца ИПЭК были охарактеризованы по данным элементного анализа, ИК-спектроскопии и дифференциальной сканирующей калориметрии с моделируемой температурой (мДСК) в сравнении с индивидуальными полимерами и их физическими смесями. Изучение набухающей способности, биоадгезии и высвобождение проводилось в среде, имитирующей искусственную слюнную жидкость (pH 7,0) при температуре $37 \pm 0,1$ °C. Мукоадгезия образцов полимеров и ИПЭК исследовалась на анализаторе текстуры TA.XTplus (Stable Micro Systems, Великобритания). Исследование высвобождения метронидазола (МД) из матриц на основе соответствующих ИПЭК производилось на приборе CE 7Smart (Sotax, Швейцария) по методу «проточная ячейка» при скорости потока 20 мл/мин в открытом цикле в течение 5 часов. Оценка количества высвободившегося МД проводилась УФ-спектрофотометрически на приборе Lambda 25 (PerkinElmer, США) при длине волны 319 нм.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований по изучению физико-химических и фармацевтических свойств подобран оптимальный состав поликомплексного носителя (ИПЭК 2) на основе Eudragit® EPO и Noveon® AA-1, который характеризуется требуемыми биоадгезивными свойствами и способностью обеспечивать контролируемое высвобождение ЛВ из таблетированной матрицы (при соотношении МД/ИПЭК-2 1:0,5) в условиях, имитирующих среду рта, что обеспечивает необходимый режим трансбуккальной доставки метронидазола в соответствии с диффузией по закону Фика.

Заключение. ИПЭК 2 является перспективным для использования в качестве носителя для трансбуккальной контролируемой доставки метронидазола.

Ключевые слова: интерполиэлектролитные комплексы, трансбуккальные системы доставки, Eudragit®, Noveon®, метронидазол, мукоадгезия, контролируемая доставка лекарственных веществ.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Р. И. Мустафин осуществлял концептуализацию и методологию исследования, а также написание статьи. В. В. Будников и С. Г. Абдуллина проводили синтез образцов, их физико-химическую оценку (элементный анализ, ИК-спектроскопия), а также оценку набухающих, биоадгезивных свойств и высвобождения. Ш. Ф. Насибуллин проводил термический анализ образцов методом мДСК, а также обсчет и построение мДСК-термограмм и ИК-спектров. Р. А. Салеев участвовал в обсуждении постановки цели и осуществлял рецензирование и корректировку статьи. Статья была написана при участии всех соавторов. Все вышеуказанные авторы согласовали итоговую версию статьи.

Благодарность. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (научный проект № 20-65-46007). Авторы также выражают благодарность компаниям Evonik Rohm GmbH и Lubrizol Advance Materials за предоставление образцов полимеров Eudragit® и Noveon® соответственно.

Для цитирования: Мустафин Р. И., Будников В. В., Абдуллина С. Г., Насибуллин Ш. Ф., Салеев Р. А. Поликомплексный носитель для трансбуккальной мукоадгезивной доставки метронидазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 83–90.

Polycomplex Carrier for Buccal Mucoadhesion Delivery of Metronidazole

Rouslan I. Moustafine^{1*}, Vitaliy V. Budnikov², Svetlana G. Abdullina¹, Shamil F. Nasibullin¹, Renat A. Saleev²

¹ – Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University, 16, Fatykh Amirkhan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia

² – Kazan State Medical University, Department of Orthopedic dentistry, 16, Alexander Butlerov str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420012, Russia

*Corresponding author: Rouslan I. Moustafine. E-mail: rouslan.moustafine@gmail.com

Received: 17.04.2020. Accepted: 21.05.2020

Abstract

Introduction. One of the well-known requirements for buccal drug delivery systems is the demonstration of mucoadhesive properties of the carrier, ensuring retention on the mucosa for a long time with the gradual release of the included drug. It should be noted that one of the advantages of buccal systems compared with oral ones is the absence of the «first pass effect» through the liver.

© Мустафин Р. И., Будников В. В., Абдуллина С. Г., Насибуллин Ш. Ф., Салеев Р. А., 2020

© Moustafine R. I., Budnikov V. V., Abdullina S. G., Nasibullin S. F., Saleev R. A., 2020

Aim. To carry out a physicochemical and pharmaceutical research of the interpolyelectrolyte complex (IPEC), obtained on the basis of pharmaceutically acceptable polymers – Eudragit® EPO and Noveon® AA-1, in comparison with the physical mixture and individual polymers, as a mucoadhesive delivery system of metronidazole for the treatment of periodontal diseases.

Materials and methods. Obtained on the basis of a pair of pharmaceutical polymers (Eudragit® EPO and Noveon® AA-1), two IPEC samples were characterized by elemental analysis, FTIR spectroscopy, and modulated temperature differential scanning calorimetry (mDSC) in comparison with individual polymers and their physical mixtures. The study of swelling ability, bioadhesion and release was carried out in a medium simulating artificial salivary fluid (pH 7.0) at a temperature of 37 ± 0.1 °C. Mucoadhesion of polymer samples and IPEC was studied using a TA.XTplus texture analyzer (Stable Micro Systems, UK). The release of metronidazole (MD) from matrices based on the developed IPEC was studied on a CE 7Smart USP 4 apparatus (Sotax, Switzerland) using the Flow Trough Cell method at a speed a flow of 20 ml/min in an open cycle within 5 hours. The amount of released MD was estimated by UV spectrophotometry on a Lambda 25 instrument (PerkinElmer, USA) at a wavelength of 319 nm.

Results and discussion. As a result of studies on the physicochemical and pharmaceutical properties, there was selected the optimal composition of a polycomplex carrier (IPEC 2) based on Eudragit® EPO and Noveon® AA-1, which is characterized by the required bioadhesive properties and the ability of providing controlled release of drug from the tablet matrix (with weight ratio MD/IPEC-2 1:0.5) in conditions mimicking oral cavity environment, which provides the necessary mode of buccal delivery of metronidazole in accordance with Fick's law of diffusion.

Conclusion. IPEC 2 is a perspective for use as carrier for buccal controlled delivery of metronidazole.

Keywords: interpolyelectrolyte complexes, buccal delivery systems, Eudragit®, Noveon®, metronidazole, mucoadhesion, controlled drug delivery.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Rouslan I. Moustafine – conceptualization, methodology, writing original draft, review & editing and funding acquisition. Vitaliy V. Budnikov and Svetlana G. Abdullina has carried out the synthesis of samples, elemental analysis, FTIR spectra recording, evaluation of swelling ability, release and bioadhesive properties. Shamil F. Nasibullin has carried out mDSC experiments and all calculations regarding thermal analysis and FTIR. Renat A. Saleev has took part in discussing of the aim and review & editing. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Acknowledgment. This work was financially supported by the Russian Science Foundation (RSF) in the framework of research project № 20-65-46007 (to R.I.M.). The authors are also grateful to Evonik Rohm GmbH and Lubrizol Advanced Materials for providing samples of Eudragit® and Noveon® polymers, respectively.

For citation: : Moustafine R. I., Budnikov V. V., Abdullina S. G., Nasibullin S. F., Saleev R. A. Polycomplex carrier for buccal mucoadhesion delivery of metronidazole. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 83–90.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых уникальных носителей лекарственных веществ (ЛВ), представляющих собой интерполиэлектrolитные комплексы (ИПЭК), полученные из полимеров фармацевтического назначения, обладающие выраженными биоадгезивными свойствами, является перспективным направлением фармацевтической технологии [1]. Под мукоадгезивными свойствами носителя понимают способность системы доставки на его основе закрепиться на биологической поверхности, например на слизистых оболочках. Преимущества мукоадгезивных систем связано с продлением времени пребывания системы в месте всасывания ЛВ. Тесный контакт мукоадгезивной системы доставки со слизистой оболочкой рта генерирует, как известно, большой градиент концентрации, таким образом увеличивая скорость проникновения ЛВ [2–6]. Ранее нами была показана перспективность интерполимерных сочетаний различных типов полианионных полимеров Carborol® (карбополи, карбомеры, карбоксивиниловые полимеры, редкоштитые полимеры полиакриловой кислоты) и сополимера поликатионного характера – Eudragit® EPO как для доставки диклофенака натрия в толстый отдел кишечника [7–11], так и в быстродиспергируемых во рту системах, содержащих клобетазол [12], предлагаемых для лечения различных воспалительных заболеваний в гастроэнтерологии или стоматологии соответственно.

Полученные в данном исследовании ИПЭК, состоящие из Noveon® AA-1, характеризующегося выраженными биоадгезивными свойствами, и Eudragit® EPO, с уже выявленной перспективностью при использовании в качестве вспомогательных веществ в трансмукозальных системах доставки лекарств в виде быстродиспергируемых во рту таблеток, было решено изучить и в качестве трансбуккальной системы доставки метронидазола.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Eudragit® EPO – EPO (Evonik Röhm GmbH, Германия) – терполимер диметиламиноэтилметакрилата и нейтральных эфиров метакриловой кислоты, Noveon® AA-1 – AA-1 (Lubrizol Advance Materials, США) – высокомолекулярный полимер акриловой кислоты с аллиловыми эфирами полиспиртов. Исходные полимеры использовались после высушивания под вакуумом при температуре 40 °C в течение 7 дней. В качестве модельного лекарственного вещества использовали метронидазол – МД (Sigma-Aldrich, Бельгия). Для исследования биоадгезионных свойств использовали муцин, выделенный из желудков свиней (тип II) (Sigma-Aldrich, США).

Синтез интерполиэлектrolитных комплексов на основе сополимеров Eudragit® осуществляли в водно-солевой среде. В результате нами было получено два образца EPO/AA-1 (таблица 1).

Таблица 1. Образцы интерполиэлектролитных комплексов на основе полимеров Eudragit® EPO и Noveon® AA-1

Table 1. The samples of interpolyelectrolyte complexes based on Eudragit® EPO and Noveon® AA-1 polymers

Условное обозначение	Полимеры	Соотношение полимеров в реакционной смеси (моль/моль)	Состав ИПЭК* (моль/моль)
ИПЭК-1	ЕРО/АА-1	1:1	1:2
ИПЭК-2	ЕРО/АА-1	1:0,5	1:1,42

Примечание: *По данным элементного анализа.

Note: *According to elemental analysis.

Синтез образцов ИПЭК ЕРО/АА-1 проводили при двух мольных соотношениях: 1:1 и 1:0,5, по методике, опубликованной ранее [12], при длительности проведения интерполиэлектролитной реакции в течение 7 суток при периодическом перемешивании. Выделенные осадки ИПЭК высушивали при комнатной температуре в течение 2 суток с последующим досушиванием в вакуум-сушильном шкафу (Binder VD 23, Германия) при температуре 40 °С до постоянной массы.

Подтверждение образования ИПЭК составов ЕРО : АА-1 1:1 и 1:0,5 (по молям) проводили методом элементного анализа с использованием анализатора Thermo Flash 2000 CHNS/O (Thermo Fisher Scientific, Великобритания), а изучение их структурных особенностей методами ИК-спектроскопии на приборе Nicolet iS5 с приставкой однократного НПВО Smart iTR (Thermo Scientific, США) и дифференциальной сканирующей калориметрии с модулируемой температурой (мДСК) на приборе Discovery™ DSC (TA Instruments, США).

Изучение мукоадгезии и набухаемости таблетированных полимерных матриц (без ЛВ), а также высвобождение МД из них, проводили при температуре 37,0 ± 0,1 °С в среде искусственной слюны, имитирующей рот (рН 7,0) и приготовленной по известной методике [13].

Мукоадгезию полученных матриц к муциновым компактам изучали на анализаторе текстуры TA.XTplus (Stable Micro Systems, Великобритания), в качестве субстрата использовали компакты муцина диаметром 13 мм, массой 150 мг, полученные путем прессования на ручном гидравлическом прессе для ИК-спектроскопии (PerkinElmer, США) при давлении 2,45 МПа.

Изучение набухающей способности таблетированных поликомплексных матриц проводили в течение 5 часов. Таблетки порошка ИПЭК массой 170 мг и диаметром 13 мм, полученные путем прессования на ручном гидравлическом прессе для ИК-спектроскопии (PerkinElmer, США) при давлении 2,45 МПа, погружали в среду объемом 40 мл. Каждые 15 минут проводилось взвешивание образцов на аналитических весах Vibra (Shinko Denshi Co Ltd., Япония) с точностью до 0,0001. Степень набухания ($H_{\%}$) определяли по формуле:

$$H_{\%} = (m_2 - m_1/m_1) \cdot 100,$$

где m_1 – масса сухого образца; m_2 – масса набухшего образца.

Высвобождение МД проводили на приборе «проточная ячейка» CE 7Smart (Sotax, Швейцария) при скорости потока 20 мл/мин в открытом цикле в течение 5 часов. Оценка количества высвободившегося МД проводилась УФ-спектрофотометрически на приборе Lambda 25 (PerkinElmer, США) при длине волны 319 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью выявления отличий анализируемых полимеров от полученных нами поликомплексов, в сравнении с физическими смесями тех же полиэлектролитов в установленных соотношениях нами, был предложен метод ИК-спектроскопии и мДСК.

На ИК-спектрах (рисунок 1) появляется полоса поглощения при 1574 см⁻¹, отсутствующая у индивидуальных полимеров и их ФС, которая обусловлена образованием ионных связей между карбоксилатными группами Noveon® AA-1 и протонированными диметиламиногруппами ЕРО [8, 11, 12]. Появление новых полос поглощения, ранее отсутствующих у исходных полимеров, доказывает образование между ними ИПЭК. С целью отличия новой полосы поглощения при 1574 см⁻¹, вследствие образования межмакромолекулярных ионных связей противоположно заряженных полиэлектролитов от их несвязанных ионизированных групп, нами были получены и сняты ИК-спектры специально полученных ионизированных форм исследуемых полимеров.

Представленные на рисунке 2 ИК-спектры свидетельствуют, что свободные ионизированные карбоксильные группы АА-1 (АА-1_{ion}) характеризуются появлением полосы при 1557 см⁻¹, сдвигающейся в случае ФС обоих составов до 1568 см⁻¹, что вполне может быть следствием их частичного взаимодействия с ионизированным ЕРО (ЕРО_{ion}) в процессе их приготовления. Изменений в ИК-спектрах ЕРО_{ion}, при этом, не выявлено.

По результатам мДСК (рисунок 3) индивидуальные полимеры имеют различающиеся температуры стеклования (T_g) –50,7 °С (ЕРО) и –131,3 °С; T_g поликомплексов находятся в пределах между T_g индивидуальных полимеров, что совпадает с данными литературы [12–14]. Следует отметить, что по мере увеличения доли термопластичного ЕРО в образцах АА-1/ЕРО, прослеживается тенденция к снижению T_g у ИПЭК 2 (T_g = 118,1 °С) по сравнению с ИПЭК 1 (T_g = 128,2 °С). В случае ФС T_g практически полностью совпадают с таковыми у индивидуальных полимеров.

Термоанализ ионизированных форм полимеров (рисунок 4) показал увеличение в их T_g : –55,4 °С (ЕРО) и –197,4 °С (АА-1), куда более выраженное у последнего. При анализе ФС на основе АА-1_{ion} – ЕРО_{ion} в обоих составах выявлено отсутствие T_g , характерных для ионизированных полиэлектролитов с детекцией единственных (а не двух, как следовало ожидать) T_g .

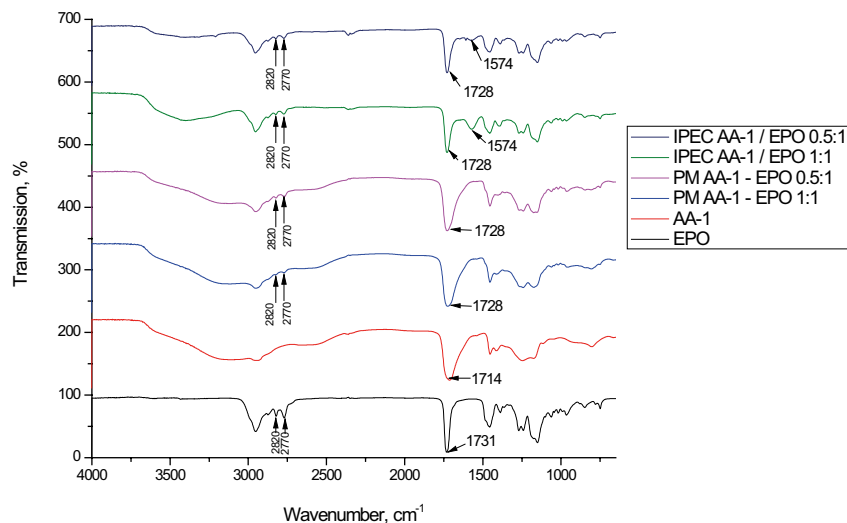


Рисунок 1. ИК-спектры анализируемых полимеров, ИПЭК и их физических смесей (ФС), аналогичного состава

Figure 1. FTIR spectra of the analyzed samples of polymers, IPECs and its physical mixtures (PM) with the same compositions

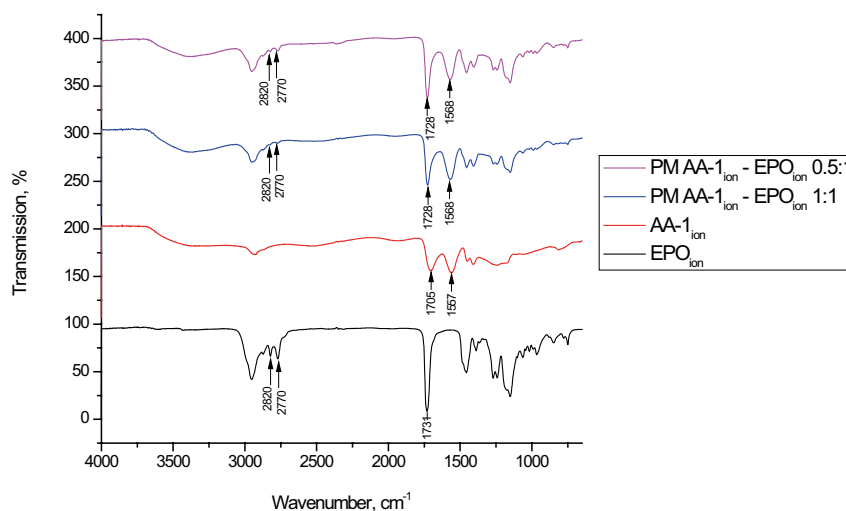


Рисунок 2. ИК-спектры ионизированных форм полимеров и их физических смесей (ФС), аналогичного состава

Figure 2. FTIR spectra of ionized form of the polymers and its physical mixtures (PM) with the same compositions

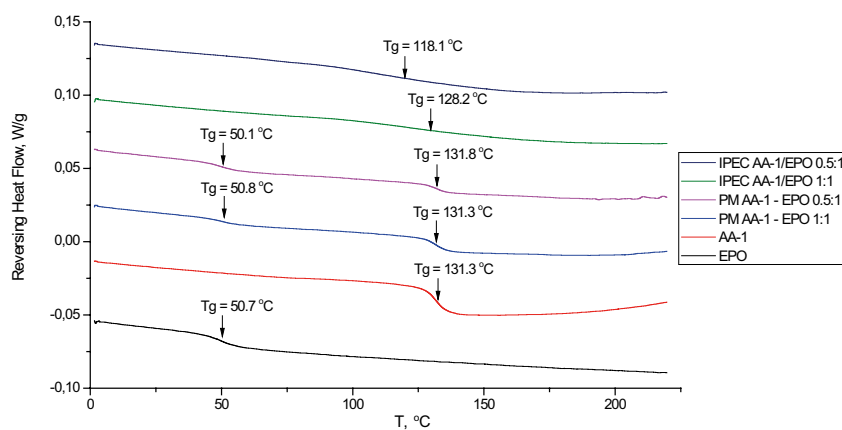


Рисунок 3. ДСК термограммы анализируемых полимеров, ИПЭК и их физических смесей (ФС), аналогичного состава

Figure 3. DSC thermograms of the analyzed samples of polymers, IPECs and its physical mixtures (PM) with the same compositions

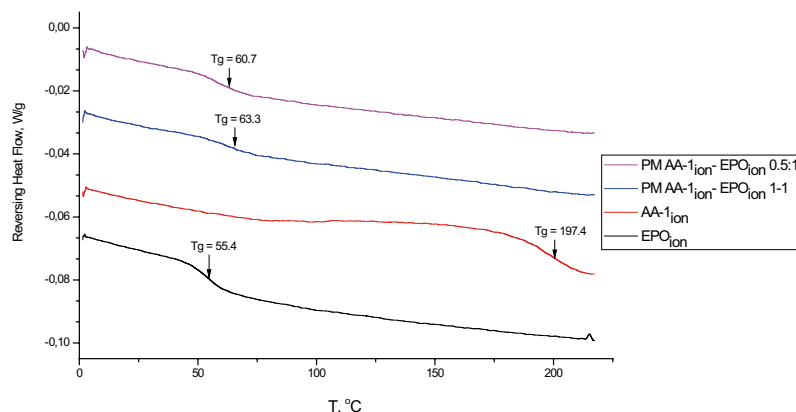


Рисунок 4. ДСК термограммы ионизированных форм полимеров и их физических смесей (ФС), аналогичного состава

Figure 4. DSC thermograms of ionized form of the polymers and its physical mixtures (PM) with the same compositions

Таким образом, по данным ИК-спектроскопии и мДСК, кроме двух синтезированных ИПЭК (1 и 2), ФС, полученные на основе ионизированных форм полимеров, так же представляют собой поликомплексы, структуры которых хоть и похожи, но, по всей видимости, различны. Подтверждением служат не только различие в характеристических полосах образцов на ИК-спектрах, но и различающиеся T_g . Интересно отметить, что при практически совпадающих T_g ИПЭК 1 и ФС на основе $AA-1_{ion} - EPO_{ion}$ 1:1, 128,2 °C и 129,6 °C соответственно, характеристические полосы и их интенсивности на ИК-спектрах различаются.

Принимая во внимание, что по данным литературы [15–17], ионизированные формы изучаемых семейств полимеров фармацевтического назначения (Carbopol® и Eudragit®), характеризуются усилением мукоадгезивных свойств, то было бы интересно сравнить полученные на их основе матрицы по набухаемости и мукоадгезии с коммерчески выпускаемыми (неионизированными) формами.

Согласно полученным результатам по набухаемости (рисунок 5), в случае индивидуальных, ионизированных форм полимеров и их физических смесей, ожидалось, что с уменьшением доли редкосшитого компонента (AA-1) в матрицах, степень набухания также будет снижаться, но, как видно, эта логичная закономерность справедлива далеко не для всех образцов: $AA-1_{ion} > \text{ФС } AA-1_{ion} - EPO_{ion} 1:1 > AA-1 > \text{ФС } AA-1 - EPO 1:1$; $\text{ФС } AA-1 - EPO 0,5:1$; $\text{ФС } AA-1_{ion} - EPO_{ion} 0,5:1 > \text{ИПЭК 1} > \text{ИПЭК 2} > EPO_{ion} > EPO$. Наиболее интересным было сравнить образцы поликомплексов (ИПЭК 1 и ИПЭК 2) и ФС на основе ионизированных полимеров, которые, согласно проведенному физико-химическому исследованию, также имеют структуру ИПЭК. Оба исходных поликомплекса имеют очень различающиеся, но мало изменяющиеся во времени профили набухания, при этом ИПЭК 1 превосходит ИПЭК 2 практически в 4 раза, и сравним у последнего с EPO и EPO_{ion} . Профили же ФС $AA-1_{ion} - EPO_{ion}$ по своему характеру

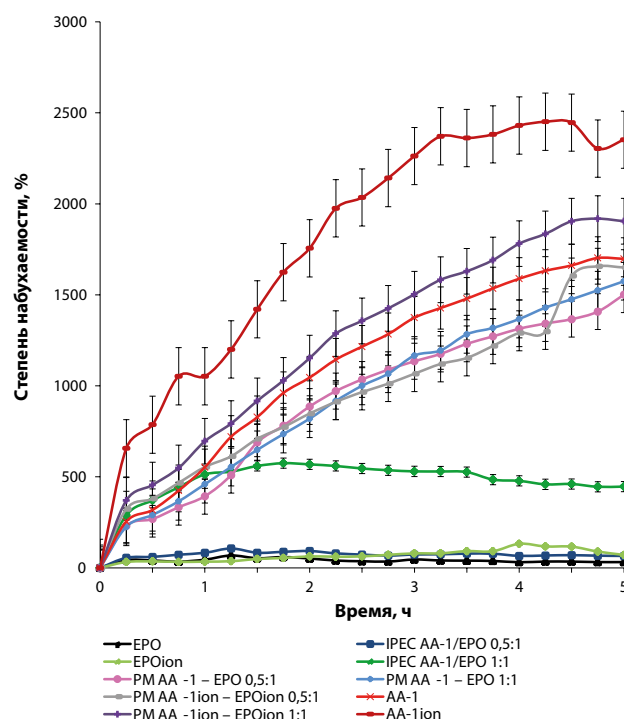


Рисунок 5. Профили поведения матриц на основе ИПЭК в среде, имитирующей рот

Figure 5. IPEC matrix behavior profiles in the mimicking oral cavity media

ру не сильно отличаются от содержащих AA-1 ($AA-1_{ion}$) матриц, имеющих тенденцию к выходу на максимум в степенях набухаемости к концу эксперимента. Следует отметить, что выявленная нами схожесть в значениях T_g ИПЭК 1 и ФС на основе $AA-1_{ion} - EPO_{ion}$ 1:1, продемонстрировала различие их свойств. Принимая во внимание полученные результаты по сравнительному изучению набухаемости и схожесть в профилях ФС на основе как ионизированных полимеров, так и не ионизированных, мы приняли решение не исследовать ФС $AA-1_{ion} - EPO_{ion}$ в последующих тестированиях матричных систем с их участием.

С целью предопределения возможности использования изучаемых ИПЭК в мукоадгезивных трансбуккальных системах была проведена оценка биоадгезии поликомплексных матриц (ИПЭК 1 и ИПЭК 2) к компактам муцина в сравнении образцами на основе изучаемой группы полимеров (таблица 2).

Таблица 2. Сравнительная характеристика биоадгезивной способности ИПЭК и изучаемых образцов полимеров

Table 2. Comparative assessment of bioadhesive ability of IPEC and all other analyzed samples of the polymers

Образец	Сила отрыва F, (Н)*	Работа адгезии W, (Н · м)**
EPO	9,857 ± 1,512	53,619 ± 7,403
AA-1	5,835 ± 0,342	40,73 ± 11,199
IPEC AA-1/EPO 1:1	9,054 ± 1,003	38,306 ± 11,307
IPEC AA-1/EPO 0,5:1	8,926 ± 1,044	50,421 ± 15,749
PM AA-1 – EPO 1:1	6,688 ± 0,161	23,844 ± 7,146
PM AA-1 – EPO 0,5:1	7,656 ± 0,294	31,859 ± 9,306
AA-1 _{ion}	5,801 ± 0,227	37,091 ± 6,309
EPO _{ion}	9,284 ± 0,839	81,922 ± 23,222

Примечание: *Н – ньютон; **Н · м – ньютон-метр.
Note: *Н – Newton; **Н · м – Newton meter.

Оба образца ИПЭК характеризуются более высокой силой отрыва (F) по сравнению с ФС и AA-1. Как известно, в структуре муцина имеются остатки сиаловых кислот, с которыми, предположительно, и происходит взаимодействие ИПЭК по дефектным участкам, содержащим ионизированные диметиламиногруппы Eudragit® EPO, что подтверждается максимальной работой адгезии (W) для EPO_{ion}. Согласно проведенному тестированию биоадгезивных свойств лучшими, с точки зрения работы адгезии, является образец ИПЭК 2, уступающий по обоим показателям EPO и EPO_{ion}. Однако использование матриц на основе чистого EPO сопряжено с рядом неудобств, к числу которых относится дезинтеграция таблеток на его основе в нейтральных средах со значением pH больше 5,0 ввиду потери заряда на цепочках макромолекул и последующая гидрофобизация его структуры [18].

В этой связи для последующей оценки транспортных свойств был отобран только образец ИПЭК 2, с использованием в качестве ЛВ – метронидазола, применяемого, как известно, в комплексной терапии заболеваний рта инфекционного генеза, а также заболеваний пародонта [18].

Профили высвобождения метронидазола из матрицы на основе ИПЭК 2 AA-1/EPO 0,5:1 с различной долей содержания ЛВ в таблетированной матрице приведены на рисунке 6.

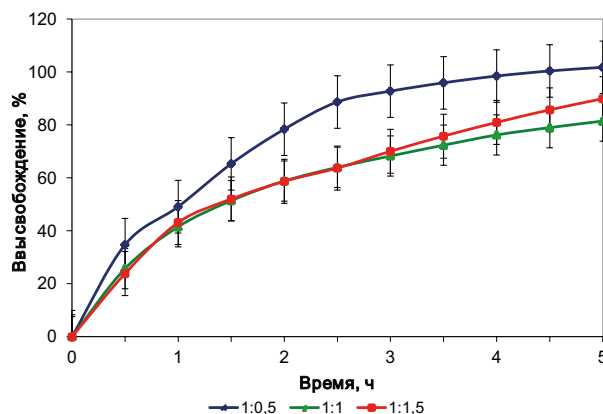


Рисунок 6. Профили высвобождения метронидазола из поликомплексных матриц при различном соотношении ИПЭК-2/ЛВ в среде, имитирующей рот

Figure 6. Release profiles of metronidazole from IPEC matrices in the mimicking oral cavity media

Для оценки механизма, лежащего в основе процесса высвобождения МД из поликомплексных матриц на основе ИПЭК-2, было проведено математическое моделирование высвобождения с использованием уравнения *Korsmeyer-Peppas* [19]. Результаты для образцов матриц с разным соотношением ЛВ : носитель представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты математического моделирования высвобождения метронидазола из таблетированных матриц на основе ИПЭК-2 при различном соотношении МД : носитель

Table 3. Results of mathematic modeling of metronidazole release from IPEC-2 tableting matrices with different compositions MD : carrier

	Состав матриц МД:ИПЭК-2 (по массе)		
	1:0,5	1:1	1:1,5
Экспонента высвобождения (n)	0,46 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,52 ± 0,03
Константа высвобождения (k)	8,06 ± 1,44	5,75 ± 0,80	4,70 ± 0,68
Коэффициент корреляции R ²	0,9828	0,9901	0,9917
Механизм транспорта	диффузия по закону Фика	диффузия по закону Фика	диффузия по закону Фика

Высвобождение МД из матриц на основе всех выбранных составов (1:0,5; 1:1 и 1:1,5) происходит в соответствии с диффузией по закону Фика, то есть движущей силой является набухание матрицы в среде растворения [19]. При этом состав с соотношением (по массе) МД/ИПЭК-2 1:0,5 характеризуется максимальным значением константы скорости высвобождения и, соответственно, более быстрым достижением максимальной концентрации ЛВ, что, учитывая временной интервал аппликации трансбуккальной системы, кажется нам вполне соответствующей поставленной цели [18, 20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенных исследований были изучены физико-химические и фармацевтические свойства синтезированных поликомплексов, определены их стехиометрические составы и оптимальное соотношение с ЛВ, необходимые для разработки трансбуккальной системы доставки метронидазола.

ИПЭК 2 характеризуется требуемыми биоадгезивными свойствами и способностью обеспечивать пролонгированное высвобождение метронидазола в среде, имитирующей среду рта. При этом состав МД/ИПЭК-2 1:0,5 является перспективным для использования ИПЭК 2 в качестве носителя для биоадгезивных систем с контролируемой доставкой метронидазола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мустафин Р. И. Интерполимерные сочетания химически элементарных типов сополимеров Eudragit® как новое направление в создании пероральных систем доставки и лекарственных форм с модифицированным высвобождением (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2011; 45(5): 28–39. DOI: 10.30906/0023-1134-2011-45-5-28-39.
2. Lee J. W., Park J. H., Robinson J. R. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000; 89(7): 850–866. DOI:10.1002/1520-6017(200007)89:7<850::AID-JPS2>3.0.CO;2-G.
3. Cook M. T., Khutoryanskiy V. V. Mucoadhesion and mucosa-mimetic materials – A mini review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015; 495: 991–998. DOI:10.1016/j.ijpharm.2015.09.064.
4. Cook S. L., Bull S. B., Methven L., Parker J. K., Khutoryanskiy, V. V. Mucoadhesion: A food perspective. *Food Hydrocolloids*. 2017; 72: 281–296. DOI:10.1016/j.foodhyd.2017.05.043.
5. Pather S. I., Rathbone M. J., Senel S. Current status and the future of buccal drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2008; 5(5): 531–542. DOI:10.1517/17425247.5.5.531.
6. Salamat-Miller N., Chittchang M., Johnston T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005; 57: 1666–1691. DOI: 10.1016/j.addr.2005.07.003.
7. Kabanova T. V., Zdanova E. R., Moustafine R. I. Characterization of Eudragit® E100/Carbomer 940P interpolyelectrolyte complexes using swellability measurements. *Journal of Controlled Release*. 2006; 116(2): e33–e35. DOI:10.1016/j.jconrel.2006.09.035.
8. Мустафин Р. И., Кабанова Т. В., Жданова Е. Р., Буховец А. В., Гарипова В. Р., Насибуллин Ш. Ф., Кеменова В. А. Получение и физико-химическая оценка нового носителя на основе интерполиэлектrolитного комплекса, образованного Eudragit® EPO и Carbomer 940. *Химико-фармацевтический журнал*. 2010; 44(5): 39–41. DOI: 10.30906/0023-1134-2010-44-5-39-41.
9. Мустафин Р. И., Кабанова Т. В., Жданова Е. Р., Буховец А. В., Гарипова В. Р., Насибуллин Ш. Ф., Кеменова В. А. Диффузионно-транспортные свойства поликомплексных матричных систем, образованных Eudragit® EPO и Carbomer 940. *Химико-фармацевтический журнал*. 2010; 44(3): 38–41. DOI: 10.30906/0023-1134-2010-44-3-38-41.
10. Мустафин Р. И., Кабанова Т. В., Семина И. И., Буховец А. В., Гарипова В. Р., Шиловская Е. В., Насибуллин Ш. Ф., Ситенков А. В., Казакова Р. Р., Кеменова В. А. Биофармацевтическая оценка поликомплексной матричной системы доставки в толстый отдел кишечника на основе Carbomer 940/Eudragit® EPO. *Химико-фармацевтический журнал*. 2011; 45(8): 41–44. DOI: 10.30906/0023-1134-2011-45-8-41-44.
11. Мустафин Р. И., Семина И. И., Гарипова В. Р., Буховец А. В., Ситенков А. В., Салахова А. Р., Gennari C. G. M., Cilurzo F. Сравнительное исследование поликомплексов на основе Carbopol® и противоположно заряженных полиэлектrolитов как новых систем пероральной доставки. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015; 49(1): 3–8. DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-1-3-8.
12. Garipova V. R., Gennari C. G. M., Selmin F., Cilurzo F., Moustafine R. I. Mucoadhesive Interpolyelectrolyte Complexes for the Buccal Delivery of Clobetasol. *Polymers*. 2018; 10(2): 85. DOI:10.3390/polym10010085.
13. Ruiz-Rubio L., Alonso M. L., Pérez-Álvarez L., Alonso R. M., Vilas J. L., Khutoryanskiy V. V., Formulation of Carbopol®/Poly(2-ethyl-2-oxazoline)s mucoadhesive tablets for buccal delivery of hydrocortisone. *Polymers*. 2018; 10(2): 175. DOI: 10.3390/polym10020175.
14. Gomez-Carracedo A., Alvarez-Lorenzo C., Gomez-Amoza J. L., Concheiro A. Glass transitions and viscoelastic properties of Carbopol® and Noveon® compacts. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004; 274: 233–243. DOI:10.1016/j.ijpharm.2004.01.023.
15. Singla A. K., Chawla M., Singh A. Potential Applications of Carbomer in Oral Mucoadhesive Controlled Drug Delivery System: A Review. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2000; 26: 913–924. DOI:10.1081/ddc-100101318.
16. Cilurzo F., Minghetti P., Selmin F., Casiraghi A., Montanari L. Polymethacrylate salts as new low-swellable mucoadhesive materials. *Journal of Controlled Release*. 2003; 88: 43–53. DOI: 10.1016/S0168-3659(02)00459-5.
17. Cilurzo F., Selmin F., Minghetti P., Montanari L. The effects of bivalent inorganic salts on the mucoadhesive performance of a polymethylmethacrylate sodium salt. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005; 301: 62–70. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.05.029.
18. Perioli L., Ambrogio V., Rubini D., Giovagnoli S., Ricci M., Blasi P., Rossi C. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. *Journal of Controlled Release*. 2004; 95(3): 521–533. DOI:10.1016/j.jconrel.2003.12.018.
19. Korsmeyer R. W., Gurny R., Doeller E., Buri P., Peppas N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1983; 15: 25–35. DOI:10.1016/0378-5173(83)90064-9.
20. Gupta A., Garg S., Khar R. K. Interpolymer complexation and its effect on bioadhesive strength and dissolution characteristics of buccal delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1994; 20(3): 315–325. DOI: 10.3109/03639049409050185.

REFERENCES

1. Mustafin R. I. Interpolymer combinations of chemically complementary grades of Eudragit copolymers: A new direction in the design of peroral solid dosage forms of drug delivery systems with controlled release (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2011; 45: 285–295. DOI: 0091-150X/11/4505-0285.
2. Lee J. W., Park J. H., Robinson J. R. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000; 89(7): 850–866. DOI:10.1002/1520-6017(200007)89:7<850::AID-JPS2>3.0.CO;2-G.
3. Cook M. T., Khutoryanskiy V. V. Mucoadhesion and mucosa-mimetic materials – A mini review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015; 495: 991–998. DOI:10.1016/j.ijpharm.2015.09.064.
4. Cook S. L., Bull S. B., Methven L., Parker J. K., Khutoryanskiy, V. V. Mucoadhesion: A food perspective. *Food Hydrocolloids*. 2017; 72: 281–296. DOI:10.1016/j.foodhyd.2017.05.043.
5. Pather S. I., Rathbone M. J., Senel S. Current status and the future of buccal drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2008; 5(5): 531–542. DOI:10.1517/17425247.5.5.531.
6. Salamat-Miller N., Chittchang M., Johnston T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005; 57: 1666–1691. DOI: 10.1016/j.addr.2005.07.003.

7. Kabanova T. V., Zdanova E. R., Moustafine R. I. Characterization of Eudragit® E100/Carbomer 940P interpolyelectrolyte complexes using swellability measurements. *Journal of Controlled Release*. 2006; 116(2): e33–e35. DOI:10.1016/j.jconrel.2006.09.035.
8. Mustafin R. I., Kabanova T. V., Zhdanova E. R., Bukhovets A. V., Garipova V. R., Nasibullin S. F., Kemenova V. A. Synthesis and physicochemical evaluation of new carrier based on interpolyelectrolyte complexes formed by Eudragit® EPO and Carbomer 940. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2010; 44(5): 271–273. DOI: 10.1007/s11094-010-0447-0.
9. Mustafin R. I., Kabanova T. V., Zhdanova E. R., Bukhovets A. V., Garipova V. R., Nasibullin S. F., Kemenova V. A. Diffusion-transport properties of a polycomplex matrix system based on Eudragit® EPO and Carbomer 940. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2010; 44(3): 147–150. DOI:10.1007/s11094-010-0419-4.
10. Mustafin R. I., Kabanova T. V., Semina I. I., Bukhovets A. V., Garipova V. R., Shilovskaya E. V., Nasibullin S. F., Sitenkov A. Y., Kazakova R. R., Kemenova V. A. Biopharmaceutical assessment of polycomplex matrix system based on Carbomer 940 and Eudragit® EPO for colon-specific drug delivery. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2011; 45(8): 491–494. DOI:10.1007/s11094-011-0662-3.
11. Mustafin R. I., Semina I. I., Garipova V. A., Bukhovets A. V., Sitenkov Y. A., Salakhova A. R., Gennari C. G. M., Cilurzo F. Comparative study of polycomplexes based on Carbopol® and oppositely charged polyelectrolytes as a new oral drug delivery system. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015(1); 49: 1–6. DOI: 0091-150X/15/4901-0001.
12. Garipova V. R., Gennari C. G. M., Selmin F., Cilurzo F., Moustafine R. I. Mucoadhesive Interpolyelectrolyte Complexes for the Buccal Delivery of Clobetasol. *Polymers*. 2018; 10(2): 85. DOI:10.3390/polym10010085.
13. Ruiz-Rubio L., Alonso M. L., Pérez-Álvarez L., Alonso R. M., Vilas J. L., Khutoryanskiy V. V., Formulation of Carbopol®/Poly(2-ethyl-2-oxazoline)s mucoadhesive tablets for buccal delivery of hydrocortisone. *Polymers*. 2018; 10(2): 175. DOI: 10.3390/polym10020175.
14. Gomez-Carracedo A., Alvarez-Lorenzo C., Gomez-Amoza J. L., Concheiro A. Glass transitions and viscoelastic properties of Carbopol® and Noveon® compacts. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004; 274: 233–243. DOI:10.1016/j.ijpharm.2004.01.023.
15. Singla A. K., Chawla M., Singh A. Potential Applications of Carbomer in Oral Mucoadhesive Controlled Drug Delivery System: A Review. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2000; 26: 913–924. DOI:10.1081/ddc-100101318.
16. Cilurzo F., Minghetti P., Selmin F., Casiraghi A., Montanari L. Polymethacrylate salts as new low-swellable mucoadhesive materials. *Journal of Controlled Release*. 2003; 88: 43–53. DOI: 10.1016/S0168-3659(02)00459-5.
17. Cilurzo F., Selmin F., Minghetti P., Montanari L. The effects of bivalent inorganic salts on the mucoadhesive performance of a polymethylmethacrylate sodium salt. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005; 301: 62–70. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.05.029.
18. Perioli L., Ambrogi V., Rubini D., Giovagnoli S., Ricci M., Blasi P., Rossi C. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. *Journal of Controlled Release*. 2004; 95(3): 521–533. DOI:10.1016/j.jconrel.2003.12.018.
19. Korsmeyer R. W., Gurny R., Docler E., Buri P., Peppas N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1983; 15: 25–35. DOI:10.1016/0378-5173(83)90064-9.
20. Gupta A., Garg S., Khar R. K. Interpolymer complexation and its effect on bioadhesive strength and dissolution characteristics of buccal delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1994; 20(3): 315–325. DOI: 10.3109/03639049409050185.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-91-97>
УДК 543.635.9



Оригинальная статья/Research article

Сравнительная характеристика определения сахаров различными методами в листьях крапивы двудомной

О. В. Тринеева^{1*}

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394006, Россия, Воронеж, Университетская пл., 1

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

Статья получена: 28.08.2019. Статья принята к печати: 13.03.2020

Резюме

Введение. Согласно данным литературы, в листьях крапивы двудомной содержатся полисахариды и слизи, как составная часть гидрофильной фракции. Данная группа биологически активных веществ (БАВ) принимает участие в проявлении физиологической активности настоя. Традиционный гравиметрический метод определения полисахаридов в лекарственном растительном сырье (ЛРС), фармацевтических субстанциях растительного происхождения и лекарственных растительных препаратах не может дать истинной картины их содержания из-за присутствия примесей. Поэтому целесообразным является определение восстанавливающих сахаров, наиболее полно извлекающихся в водную фазу при приготовлении настоя с применением современных физико-химических методов анализа.

Цель. Целью работы являлось определение суммы полисахаридов и простых сахаров в листьях крапивы двудомной различными физико-химическими методами и их сравнительная характеристика.

Материалы и методы. Проведено сравнительное определение суммы полисахаридов и простых сахаров в листьях крапивы двудомной фармакопейными методами (пикриновым, антроновым и орциновым). Идентифицированы и количественно определены свободные и связанные простые сахара методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Исследован состав и содержание свободных простых сахаров методом капиллярного электрофореза (КЭ) в сырье.

Результаты и обсуждение. Установлено содержание свободных и связанных сахаров в сырье. Самое большое содержание как суммы полисахаридов и свободных простых сахаров в полисахаридном комплексе листьев крапивы двудомной, так и суммы свободных восстанавливающих простых сахаров согласно экспериментальным данным получено пикриновым способом. Содержание пентоз в изучаемом ЛРС оказалось в четыре раза меньше, что согласуется с данными литературы о преимущественном построении полисахаридов растительных объектов из сахаров класса гексоз. Полученное суммарное содержание фракции свободных сахаров в листьях, определенное методом КЭ, на порядок меньше по сравнению со спектрофотометрическими методиками. Полученные результаты количественного определения суммы свободных и связанных простых сахаров в изучаемом ЛРС согласуются с данными определения пикриновым фармакопейным методом.

Заключение. В целом, полные сведения, в зависимости от целей анализа, о составе и количественном содержании простых и связанных сахаров в полисахаридном комплексе растительных объектов возможно получить только комбинированием спектральных методов с КЭ или ТСХ.

Ключевые слова: листья крапивы двудомной, полисахариды, простые сахара, пикриновый метод, орциновый метод, антроновый метод, дифференциальная спектрофотометрия, капиллярный электрофорез, тонкослойная хроматография.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Автор осуществлял заготовку образцов. Автором выполнены все экспериментальные работы по определению суммы полисахаридов и простых сахаров в листьях крапивы двудомной различными физико-химическими методами. Автором произведены теоретические расчеты и статистическая обработка результатов эксперимента. Автор написал текст статьи, в том числе и обсуждение результатов, а также построил все рисунки и графики, отражающие основные результаты работы.

Для цитирования: Тринеева О. В. Сравнительная характеристика определения сахаров различными методами в листьях крапивы двудомной. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 91–97.

Comparative Characteristics of Sugar Determination by Different Methods in Leaves of Nettle

Olga V. Trineeva^{1*}

1 – Voronezh State University, 1, University Square, Voronezh, 394006, Russia

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

Received: 28.08.2019. Accepted: 13.03.2020

Abstract

Introduction. According to the literature, nettle leaves contain polysaccharides and mucus as an integral part of the hydrophilic fraction. This group of biologically active substances (BAS) is involved in the manifestation of the physiological activity of the infusion. The traditional gravimetric method for the determination of polysaccharides in medicinal plant raw materials (PRM), pharmaceutical substances of plant origin and medicinal herbal preparations cannot provide a true picture of their content due to the presence of impurities. Therefore, it is advisable to determine the reducing sugars that are most fully extracted into the aqueous phase during the preparation of the infusion using modern physicochemical methods of analysis.

Aim. The aim of the work was to determine the amount of polysaccharides and simple sugars in nettle leaves by various physico-chemical methods and their comparative characteristics.

Materials and methods. A comparative determination of the sum of polysaccharides and simple sugars in the leaves of nettle by pharmacopoeial methods (picric, anthrone and orcinic) was carried out. Free and bound simple sugars were identified and quantified by thin layer chromatography (TLC). The composition and content of free simple sugars was studied by capillary electrophoresis (CE) in raw materials.

© Тринеева О. В., 2020

© Trineeva O. V., 2020

Results and discussion. The content of free and bound sugars in raw materials has been established. The largest content of both the sum of polysaccharides and free simple sugars in the polysaccharide complex of nettle leaves, as well as the sum of free reducing simple sugars, according to experimental data, was obtained using the picrine method. The content of pentoses in the studied PRM was four times less, which is consistent with the literature data on the preferential construction of polysaccharides of plant objects from sugars of the hexose class. The resulting total content of the fraction of free sugars in the leaves, determined by the CE method, is an order of magnitude less compared with spectrophotometric methods. The obtained results of quantitative determination of the amount of free and bound simple sugars in the studied PRM are consistent with the determination data by the picrine pharmacopoeial method.

Conclusion. In general, complete information, depending on the goals of the analysis, on the composition and quantitative content of simple and related sugars in the polysaccharide complex of plant objects can only be obtained by combining spectral methods with CE or TLC.

Keywords: nettle leaves, polysaccharides, simple sugars, picrine method, orcin method, anthrone method, differential spectrophotometry, capillary electrophoresis, thin layer chromatography.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. The author procured samples. The author carried out all the experimental work on determining the sum of polysaccharides and simple sugars in the leaves of nettle with various physical and chemical methods. The author made theoretical calculations and statistical processing of the experimental results. The author wrote the text of the article, including a discussion of the results, and also built all the drawings and graphs that reflect the main results of the work.

For citation: Trineeva O. V. Comparative characteristics of sugar determination by different methods in leaves of nettle. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 91–97.

ВВЕДЕНИЕ

Анализ литературы за последние 20 лет показал, что при контроле качества лекарственных средств, содержащих моносахариды, а также при исследовании состава простых сахаров в полисахаридных комплексах лекарственных растений, биологически активных добавках, изделиях пищевого и косметического назначения и не только, предпочтение отдается физико-химическим методам, как наиболее экспрессным, чувствительным и информативным [1–7].

Метод определения сахаров с пикриновой кислотой описан в нормативной документации (НД) на ЛРС «Мать-и-мачехи листья» [1, 9], а также ЛРП «Ламинарид», «Алтейного корня экстракт сухой», «Сок подорожника», «Арменикум» [1]. Кроме пикринового метода, в ОФС ГФ XIII изд. «Определение сахаров спектрофотометрическими методами» [8] были включены антроновый и орциновый способы. В ГФ РФ XIV издания подобной ОФС не представлено [9].

Согласно данным литературы [1, 10], в листьях крапивы содержатся полисахариды и слизи, как составная часть гидрофильной фракции. Данная группа биологически активных веществ (БАВ) принимает участие в проявлении физиологической активности настоя. Традиционный гравиметрический метод определения полисахаридов в лекарственном растительном сырье (ЛРС), фармацевтических субстанциях растительного происхождения и лекарственных растительных препаратах (ЛРП) не может дать истинной картины их содержания из-за присутствия примесей [1]. Поэтому целесообразным является определение восстанавливающих сахаров, наиболее полно извлекающихся в водную фазу при приготовлении настоя.

Целью настоящей работы являлось определение суммы полисахаридов и простых сахаров в листьях крапивы двудомной различными физико-химическими методами и их сравнительная характеристика.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлось высушенное измельченное ЛРС крапивы двудомной, собранное в Воронежской области согласно правилам заготовки данного вида сырья летом 2018 года. Все реактивы и растворители были использованы марки х.ч. и ч.д.а. (ЗАО «Вектон», СПб., Россия). В качестве стандартных образцов в работе использованы субстанции гекса- и пентасахаров: глюкоза, фруктоза, рамноза и ксилоза (ЗАО «Вектон», СПб., Россия; степень чистоты не менее 99 %).

Для суммарного количественного определения простых сахаров, как свободных, так и связанных в исследуемом сырье использованы методики, изложенные в ОФС ГФ XIII изд. «Определение сахаров спектрофотометрическими методами» [8]. В более ранних работах авторами [11, 12] подобраны и обоснованы оптимальные условия экстракции анализируемой группы БАВ из изучаемого ЛРС, а также разработана и валидирована методика определения сахаров пикриновым методом применительно к листьям крапивы двудомной. Исследования проведены на спектрофотометре Hitachi U-1900 (Япония). Приготовление антронового и орцинового реактивов, раствора пикриновой кислоты, а также других вспомогательных реактивов осуществляли по ОФС ГФ XIII изд. «Определение сахаров спектрофотометрическими методами» [8] и ГФ ГФ XIV изд. «Мать-и-мачехи листья» [9].

Метод капиллярного электрофореза основан на разбавлении жидких проб дистиллированной водой и экстракции сахаров из твердых проб дистиллированной водой, и последующем разделении, а также количественном определении анализируемых компонентов. Детектирование компонентов проводят косвенным способом, регистрируя поглощение при длине волны 254 нм («Капель-105М», Россия, СПб., «Люмекс»). Сбор, обработку и вывод данных осуществляют

с помощью персонального компьютера с операционной системой не ниже «Windows® 2000/XP», на котором установлено специализированное программное обеспечение. Фоновый электролит: на основе сорбата калия с добавкой ЦТАБ, pH = 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 °C [13].

Авторами также разработана и запатентована [14] методика хроматографического разделения и количественного определения моносахаридов (глюкозы, рамнозы и ксилозы) в тонком слое сорбента, использованная в данной работе: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» 10 × 15 см ПТСХ-АФ-А (Россия); элюент – н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2); проявитель – реактив, состоящий из сульфаниламида и о-фталевой кислоты; объем пробы – 2 мкл водного раствора с содержанием моносахаридов 10 мг/мл; время насыщения камеры парами элюента – 10 мин; время элюирования – 7 часов; время выдерживания пластинки в термостате при $t^{\circ} \geq 100$ °C – 3–5 мин; чувствительность определения $2,5\text{--}5 \cdot 10^{-6}$ г моносахарида в пробе, нанесенной на пластинку. Сразу же после проявления хроматографических зон, пластины сканировали с помощью планшетного сканера (разрешение не менее 300 dpi), а полученные изображения обрабатывали компьютерной программой «Sorbfil Videodensitometer» (v1.7, производитель ЗАО «Сорб-полимер», Россия, Краснодар). В результате получали треки в координатах R_f – интенсивность. Установлены линейные зависимости между содержанием моносахаридов и площадью хроматографической зоны в диапазоне изучаемых концентраций для проведения количественного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты количественного определения суммы полисахаридов и свободных простых сахаров в полисахаридном комплексе листьев крапивы двудомной фармакопейными спектрофотометрическими методами (рисунки 1–3) представлены в таблице 1. Определение суммы свободных и связанных простых сахаров проводили с помощью предварительного кислотного гидролиза ЛРС, а сумму свободных простых сахаров без гидролиза в условиях, описанных авторами ранее [11, 12].

Многие из известных способов (в том числе вышеперечисленные спектрофотометрические) позволяют определять только суммарное содержание сахаров, как свободных, так и связанных в полисахаридных комплексах без достоверной информации о присутствии отдельных компонентов. Кроме того, полученные результаты часто оказываются несколько завышенными, ввиду химической неизбирательности используемых реактивов к определяемой группе БАВ. Так, например, в основе пикринового метода лежит цветная реакция моносахаридов с пикриновой кисло-

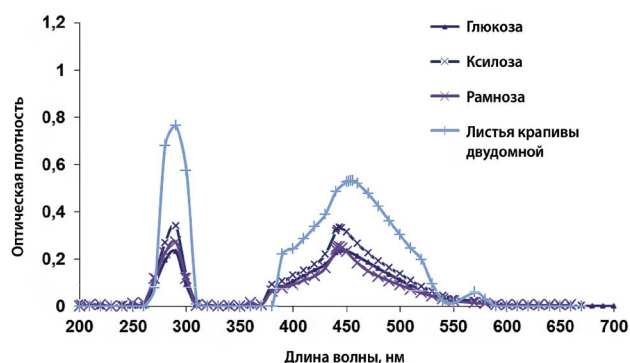


Рисунок 1. Пикриновый метод. Спектры поглощения продуктов реакции стандартных образцов простых сахаров и извлечений из изучаемого ЛРС, полученных с применением кислотного гидролиза, с пикриновой кислотой

Figure 1. The picrin method. Absorption spectra of reaction products of standard samples of simple sugars and extracts from the studied LRS obtained using acid hydrolysis with picric acid

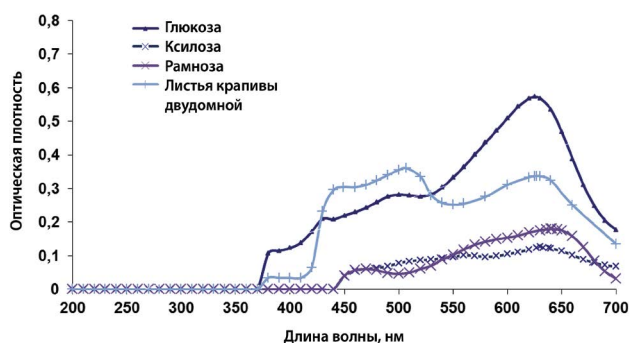


Рисунок 2. Антроновый метод. Спектры поглощения продуктов реакции стандартных образцов простых сахаров и извлечений из изучаемого ЛРС, полученных с применением кислотного гидролиза, с антроновым реактивом

Figure 2. Anthron method. Absorption spectra of the reaction products of standard samples of simple sugars and extracts from the studied LRS obtained using acid hydrolysis with an anthrone reagent

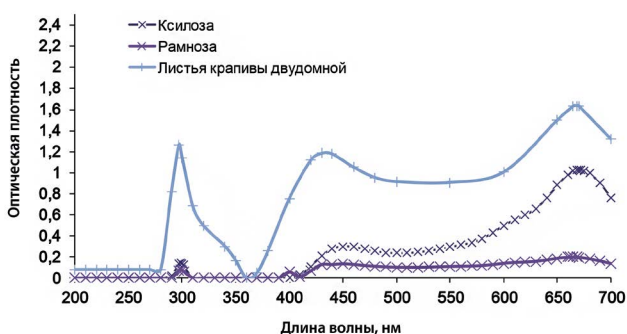


Рисунок 3. Орциновый метод. Спектры поглощения продуктов реакции стандартных образцов простых сахаров и извлечений из изучаемого ЛРС, полученных с применением кислотного гидролиза, с орцином и хлоридом железа(III)

Figure 3. Orcine method. The absorption spectra of the reaction products of standard samples of simple sugars and extracts from the studied LRS obtained using acid hydrolysis with orcin and iron(III) chloride

той с образованием аминопикриновой кислоты в результате восстановления сахаром группы NO_2 в NH_2 [2, 8, 11]. Так как извлечения из ЛРС, как правило, содержат и другие БАВ, способные вступать в редокс-процессы, содержание суммы сахаров в пересчете на глюкозу может оказаться значительно больше реального значения. Самое большое содержание как суммы полисахаридов и свободных простых сахаров в полисахаридном комплексе листьев крапивы двудомной, так и суммы свободных восстанавливающих простых сахаров согласно экспериментальным данным (см. таблицу 1) получено именно данным способом.

Таблица 1. Результаты определения суммы полисахаридов и свободных простых сахаров в полисахаридном комплексе листьев крапивы двудомной фармакопейными спектрофотометрическими методиками (в пересчете на абсолютно сухое сырье)

Table 1. The results of determining the sum of polysaccharides and free simple sugars in the polysaccharide complex of nettle leaves by dioecious pharmacopeia spectrophotometric methods (in terms of absolutely dry raw materials)

№ п/п	Метод определения	Сумма, %	
		Свободных и связанных простых сахаров	Свободных простых сахаров
1	Пикриновый метод (в пересчете на глюкозу)	15,31 ± 0,70	4,70 ± 0,22
2	Антроновый метод (в пересчете на глюкозу)	6,75 ± 0,76	3,08 ± 0,35
3	Орциновый метод (в пересчете на рамнозу)	11,73 ± 0,12	4,20 ± 0,42
	Орциновый метод (в пересчете на ксилозу)	2,29 ± 0,23	0,82 ± 0,08

Антроновый метод, основанный на расщеплении сложных углеводов до моносахаридов в сильнокислой среде с последующей их дегидратацией и образованием оксиметилфурфуrolа, образующего при реакции с антроном комплексное соединение синевато-зеленого цвета [2, 8, 11]. Данный способ является более избирательным по отношению к сахарам, так как альдегидные функциональные группы редко присутствуют в других классах БАВ растительного происхождения. Содержание как суммы полисахаридов и свободных простых сахаров в полисахаридном комплексе листьев крапивы двудомной, так и суммы свободных восстанавливающих простых сахаров согласно экспериментальным данным (см. таблицу 1) оказалось в два раза ниже по сравнению с пикриновым способом.

Орциновый метод более специфичен для определения пентасахаров, так как при нагревании пентоз (или их фосфорных производных) в присутствии кислот от них отщепляется вода и образуется фурфурол; в присутствии орцина и железа(III) хлорида при этом развивается зеленое окрашивание [2, 8, 11].

Содержание пентоз в изучаемом ЛРС оказалось в четыре раза меньше, что согласуется с данными литературы о преимущественном построении полиса-

харидов растительных объектов из сахаров класса гексоз.

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 составов таких групп БАВ, как органические кислоты (в том числе и аминокислоты), сахара, макроэлементы, водорастворимые витамины группы В и флавоноиды [13]. Вид электрофореграмм свободных сахаров исследуемого ЛРС показан на рисунках 4 и 5. Результаты определения приведены в таблице 2.

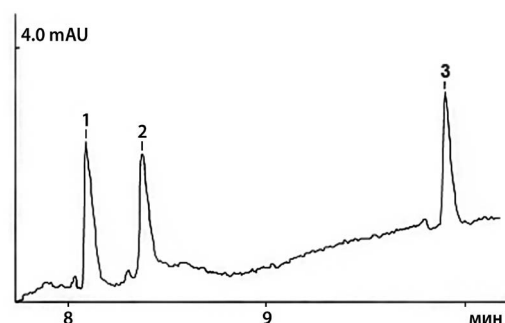


Рисунок 4. Электрофореграмма смеси стандартных образцов сахаров: 1 – фруктоза (28,5 г/л); 2 – глюкоза (28 г/л); 3 – сахароза (49 г/л)

Figure 4. Electrophoregram of a mixture of standard samples of sugars: 1 – fructose (28.5 g/l); 2 – glucose (28 g/l); 3 – sucrose (49 g/l)

Таблица 2. Результаты количественного определения свободных водорастворимых простых сахаров в исследуемом ЛРС (в пересчете на абсолютно сухое сырье) методом КЭ

Table 2. The results of the quantitative determination of free water-soluble simple sugars in the studied LRS (in terms of absolutely dry raw materials) by the CE method

№ п/п	Сахара	Содержание свободных простых сахаров, %
1	Фруктоза	0,333 ± 0,017
2	Глюкоза	0,044 ± 0,002
3	Сахароза	0,100 ± 0,005
Всего		0,477 ± 0,024

Полученные результаты демонстрируют (см. таблицу 2), что содержание индивидуальных простых сахаров в листьях крапивы двудомной невысоко (сырье не обладает сладковатым вкусом) и это характерно для данной морфологической группы сырья. Следует отметить, что особенности пробоподготовки ЛРС к проведению анализа данным методом, позволяют

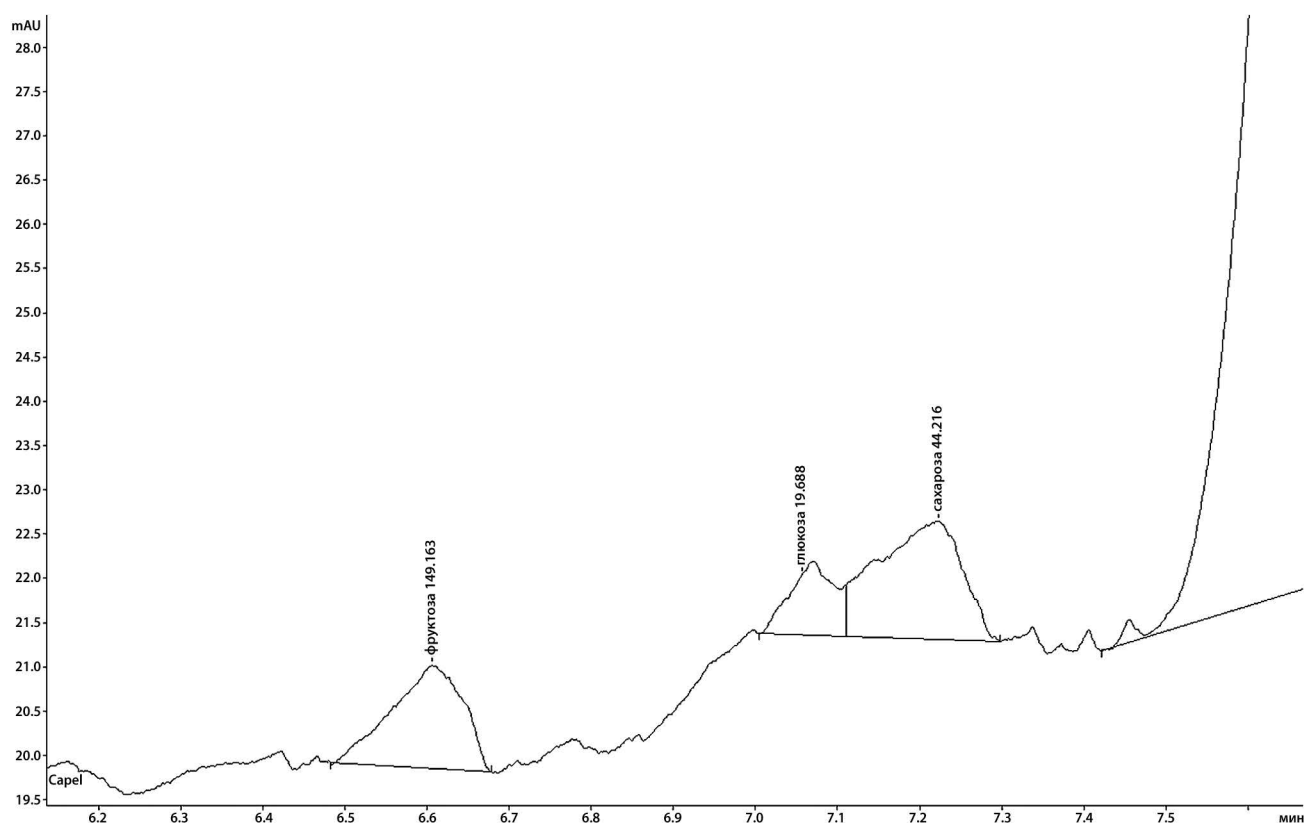


Рисунок 5. Электрофореграмма сахаров листьев крапивы двудомной (последовательность пиков: фруктоза, глюкоза, сахароза)

Figure 5. Electropherogram of sugar of leaves of nettle leaves (sequence of peaks: fructose, glucose, sucrose)

идентифицировать и определить только содержание свободных гексоз, а также дисахарида – сахарозы в изучаемом объекте. Полученное суммарное содержание фракции свободных сахаров в листьях, определенное методом КЭ, на порядок меньше по сравнению со спектрофотометрическими методиками.

Более объективный качественный и количественный анализ в настоящее время позволяют получить хроматографические методы. Значительное число научных публикаций посвящено исследованию состава, как свободных, так и связанных простых сахаров в полисахаридных комплексах растительных объектов методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [3, 5, 7, 12, 14].

Полученную в условиях кислотного гидролиза [11, 12] суммарную вытяжку из исследуемого ЛРС хроматографировали восходящим способом в условиях ранее разработанной ТСХ-методики [14]. На хроматограммах извлечений из исследуемого сырья обнаружены зоны простых сахаров характерной окраски (рисунок 6), среди которых идентифицированы глюкоза, ксилоза и рамноза по характерному значению величин R_f в сравнении с достоверными стандартными образцами (ЗАО «Вектон», СПб., Россия; степень чистоты не менее 99,5 %). Пластины сканировали, а полученные изображения обрабатывали компьютерной программой «Sorbfil Videodensitometer» (рисунок 7).



Рисунок 6. Вид хроматограммы водного извлечения из листьев крапивы двудомной, подвергнутого кислотному гидролизу (3 мкл – объем пробы)

Figure 6. Chromatogram view of water extraction from dioecious nettle leaves subjected to acid hydrolysis (3 μ l – sample volume)

Результаты количественного определения свободных и связанных моносахаридов в извлечении, а также метрологическая характеристика полученных результатов представлены в таблице 3.

Полученные результаты (таблица 3, сумма 16,66 %) согласуются с данными определения суммы свободных и связанных моносахаридов в изучаемом ЛРС пикриновым фармакопейным методом (таблица 1, сумма 15,31 %). Содержание в листьях пентоз, определенное методом ТСХ, также незначительно. Диаграм-

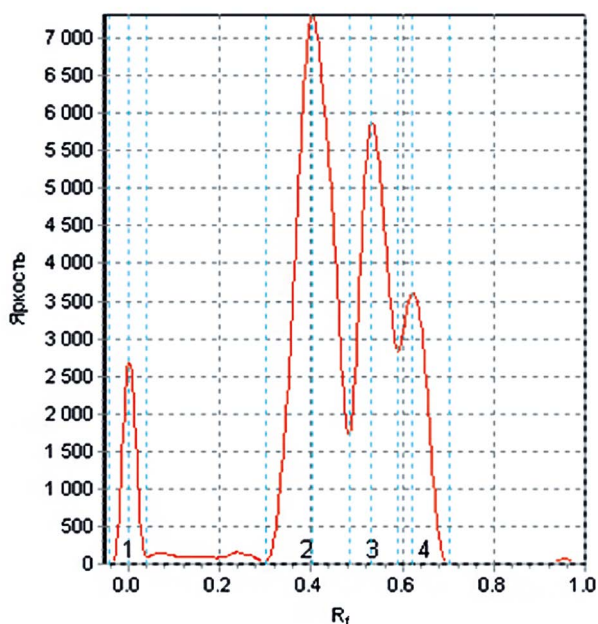


Рисунок 7. Денситограмма смеси стандартных растворов исследуемых моносахаридов (последовательность пиков: глюкоза, ксилоза, рамноза)

Figure 7. Densitogram of a mixture of standard solutions of the studied monosaccharides (sequence of peaks: glucose, xylose, rhamnose)

ма распределения содержания простых сахаров в полисахаридном комплексе листьев крапивы двудомной представлена на рисунке 8. Данные рисунка 8 показывают, что большая часть сахаров полисахаридного комплекса листьев представлена глюкозой.

Таблица 3. Результаты идентификации и количественного определения свободных и связанных моносахаридов в ЛРС (в пересчете на абсолютно сухое сырье) методом ТСХ

Table 3. The results of the identification and quantification of free and bound monosaccharides in LRS (in terms of absolutely dry raw materials) by TLC

№ п/п	Идентификация зон на хроматограммах	$R_f \pm 0,02$	Содержание свободных и связанных моносахаридов, %
1	Глюкоза	0,27	$14,07 \pm 1,26$; $\epsilon_{cp} = 8,98$ %
2	Ксилоза	0,43	$0,27 \pm 0,06$; $\epsilon_{cp} = 20,67$ %
3	Рамноза	0,52	$2,32 \pm 0,13$; $\epsilon_{cp} = 5,65$ %
4	Не идентифицированная зона	0,79	–
5	Не идентифицированная зона	0,87	–
Всего			16,66

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведено определение суммы полисахаридов и простых свободных и связанных сахаров в листьях крапивы двудомной фармакопейны-

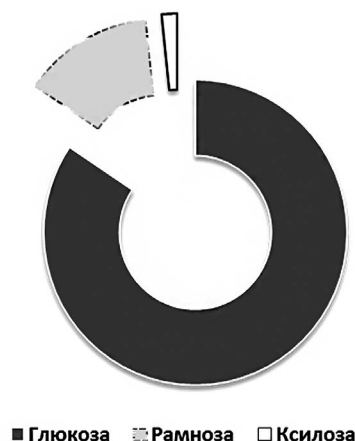


Рисунок 8. Распределение содержания простых сахаров в полисахаридном комплексе листьев крапивы двудомной

Figure 8. Distribution of simple sugars in the polysaccharide complex of dioecious nettle leaves

ми спектрофотометрическими методами. Методы не лишены недостатков, так как не дают информации о качественном составе моносахаридов в извлечении, а позволяют лишь установить суммарное содержание сахаров, как свободных, так и связанных в полисахаридных комплексах без достоверной информации о присутствии отдельных компонентов. Методом капиллярного электрофореза проведена идентификация и количественное определение свободных водорастворимых простых и дисахаров (фруктоза, глюкоза, сахароза). Методом ТСХ обнаружены глюкоза, ксилоза и рамноза с количественной оценкой свободных и связанных моносахаридов в извлечении. Наиболее информативным является метод КЭ, так как позволяет за одну аналитическую процедуру проводить качественное и количественное определение свободных простых сахаров в ЛРС. Однако полные сведения, в зависимости от целей анализа, о составе и количественном содержании простых и связанных сахаров в полисахаридном комплексе растительных объектов возможно получить только комбинированием данных методов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Скалозубова Т. А., Марахова А. И., Сорокина А. А., Федоровский Н. Н. Полисахариды в листьях и настое крапивы двудомной. *Фармация*. 2012; 2: 5–7.
2. Самылина И. А., Рудакова И. П., Аладышева Ж. И., Ковалева С. В. Определение сахаров спектрофотометрическими методами. *Фармация*. 2009; 4: 3–5.
3. Бабешина Л. Г., Горина Я. В., Колоколова А. П. и др. Исследование полисахаридов некоторых видов рода *Sphagnum* L. *Журнал Сибирского федерального университета. Химия*. 2010; 4: 413–422.
4. Колосова О. А., Горох Т. А., Фурса Н. С. Определение свободных и связанных сахаров в подземных органах валерианы сомнительной. *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. научных трудов конф. Пятигорск*. 2013; 68: 56–57.

5. Корж А. П., Гурьев А. М., Белоусов М. В., Юсубов М. С., Белянин М. Л. Моносахаридный состав полисахаридного комплекса листьев мать-и-мачехи. *Бюллетень сибирской медицины*. 2011; 5: 62–65.
6. Оленников Д. Н., Танхаева Л. М. Методика количественного определения суммарного содержания полисахаридов в семенах льна. *Химия растительного сырья*. 2007; 4: 85–90.
7. Злобин А. А., Мартинсон Е. А., Овечкина И. А., Дурнев Е. А., Оводова Р. Г., Литвинцев С. Г. Состав и свойства пектиновых полисахаридов зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* L. *Химия растительного сырья*. 2011; 1: 33–38.
8. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. М., 2015; 2: 1004. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/
9. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание. М., 2018; 4: 7019. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
10. Копытько Я. Ф., Лапинская Е. С., Сокольская Т. А. Применение, химический состав и стандартизация сырья и препаратов *Urtica* (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2011; 10: 32–40.
11. Тринеева О. В., Сливкин А. И. Определение суммы полисахаридов и простых сахаров в листьях крапивы двудомной. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2017; 1: 164–169.
12. Тринеева О. В. Теоретические и методологические подходы к стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья и масляных экстрактов на его основе. *Диссертация доктора фармацевтических наук*. 2017: 441.
13. Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». СПб.: ООО «Ведда». 2006: 212.
14. Тринеева О. В., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И., Назарова А. А. Пат. № 2642264. Российская Федерация. МКП Способ определения простых сахаров в тонком слое сорбента; заявитель и патентообладатель: ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет». – № 2016110353; заявл. 21.03.2016; опубл. 24.01.2018. Бюл. № 3: 17.
10. Kopytko Y. F., Lapinskaya E. S., Sokolskaya T. A. Application, chemical composition and standardization of raw materials and preparations of *Urtica* (review). *Chemical Pharmaceutical Journal*. 2011; 10: 32–40 (in Russ.).
11. Trineeva O. V., Slivkin A. I. Determination of the sum of polysaccharides and simple sugars in the leaves of nettle dioecious. *Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2017; 1: 164–169 (in Russ.).
12. Trineeva O. V. Theoretical and methodological approaches to standardization and quality assessment of medicinal plant materials and oil extracts based on it. *The dissertation of a doctor of pharmaceutical sciences*. 2017: 441 (in Russ.).
13. Komarova N. V., Kamentsev Ya. S. Practical Guide for the Use of Capillary Electrophoresis Systems. SPb.: LLC Veda. 2006: 212 (in Russ.).
14. Trineeva O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I., Nazarova A. A. Pat. No. 2642264. Russian Federation. MCP Method for the determination of simple sugars in a thin layer of sorbent; Applicant and patent holder: Voronezh State University. – No. 2016110353; declared 03/21/2016; publ. 01/24/2018. Bull. No. 3: 17(in Russ.).

REFERENCES

1. Skalozubova T. A., Marakhova A. I., Sorokina A. A., Fedorovsky N. N. Polysaccharides in leaves and infusion of dioica nettle. *Pharmacy*. 2012; 2: 5–7 (in Russ.).
2. Samylina I. A., Rudakova I. P., Aladysheva J. I., Kovaleva S. V. Determination of sugars by spectrophotometric methods. *Pharmacy*. 2009; 4: 3–5 (in Russ.).
3. Babeshina L. G., Gorina Ya. V., Kolokolova A. P. et al. Study of polysaccharides of certain species of the genus *Sphagnum* L. *Journal of the Siberian Federal University. Chemistry*. 2010; 4: 413–422 (in Russ.).
4. Kolosova O. A., Gorokh T. A., Fursa N. S. Determination of free and bound sugars in the underground organs of the valerian of the dubious. *Development, research and marketing of new pharmaceutical products: collection of articles. scientific works conf. Pyatigorsk*. 2013; 68: 56–57 (in Russ.).
5. Korzh A. P., Guryev A. M., Belousov M. V., Yusubov M. S., Belyanin M. L. Monosaccharide composition of the polysaccharide complex of coltsfoot leaves. *Bulletin of Siberian medicine*. 2011; 5: 62–65 (in Russ.).
6. Olennikov D. N., Tankhaeva L. M. Method for the quantitative determination of the total content of polysaccharides in flax seeds. *Chemistry of Plant Raw Materials*. 2007; 4: 85–90 (in Russ.).
7. Zlobin A. A., Martinson E. A., Ovechkin I. A., Durnev E. A., Ovodova R. G., Litvinets S. G. Composition and properties of pectin polysaccharides of hypericum perforated *Hypericum perforatum* L. *Plant Chemistry raw materials*. 2011; 1: 33–38 (in Russ.).
8. Russian Federation State Pharmacopoeia XIII ed. M., 2015; 2: 1004. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/ (in Russ.).
9. Russian Federation State Pharmacopoeia XIV ed. M., 2018; 4: 7019. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (in Russ.).

Количественное определение налтрексона гидрохлорида в назальном спрее методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

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

1 – ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (РТУ МИРЭА), 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86
2 – АО «Институт фармацевтических технологий» (АО «ИФТ»), 121353, Россия, г. Москва, Сколковское шоссе, д. 21, офис 1

*Контактное лицо: Домнина Юлия Михайловна. E-mail: domnina.yulia@mail.ru

Статья получена: 03.02.2020. Статья принята к печати: 18.03.2020

Резюме

Введение. Налтрексон – антагонист μ -опиоидных рецепторов является перспективным для лечения различных аутоиммунных и онкологических заболеваний при применении в дозах 1,5–5 мг/сут. На сегодняшний день лекарственные препараты, обеспечивающие такие дозировки налтрексона, отсутствуют. В связи с отсутствием на рынке препаратов, обеспечивающих такие дозировки налтрексона, нами был подобран состав назального спрея налтрексона гидрохлорида, содержащего водорастворимый термочувствительный полимер – полоксамер Kolliphor® P 407. Для данного состава необходимо разработать методику количественного определения активного вещества с учетом сложности состава.

Цель. Разработка и валидация методики количественного определения налтрексона гидрохлорида в назальном спрее методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали назальный спрей налтрексона гидрохлорида. Методика количественного определения налтрексона в исследуемом образце была разработана на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Dionex UltiMate 3000» (Thermo Scientific, США), оснащенном диодно-матричным детектором.

Результаты и обсуждение. Изучена возможность применения изократических и градиентных режимов хроматографирования для количественного определения налтрексона гидрохлорида в назальном спрее. На основании этих результатов предложена новая методика определения с использованием градиентного режима, которая позволяет минимизировать влияние полимерного компонента в исследуемом образце на результаты анализа.

Заключение. Разработана новая методика, позволяющая осуществлять идентификацию и определять количественное содержание налтрексона гидрохлорида в назальном спрее, содержащем в качестве загустителя водорастворимый термочувствительный полоксамер в высокой концентрации. Разработанная методика была валидирована по параметрам: правильность, прецизионность, специфичность, линейность.

Ключевые слова: назальный спрей, налтрексон, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация, градиентный режим.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы принимали активное участие в разработке эксперимента, анализе полученных данных, написании текста статьи и ее обсуждении.

Для цитирования: Домнина Ю. М., Суслов В. В., Кедик С. А., Ворфоломеева Е. В., Мелешко А. В. Количественное определение налтрексона гидрохлорида в назальном спрее методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 98–104.

Quantitative Determination of Naltrexone Hydrochloride in a Nasal Spray by High-performance Liquid Chromatography

Yuliya M. Domnina^{1,2*}, Vasily V. Suslov^{1,2}, Stanislav A. Kedik^{1,2}, Elena V. Vorfolomeeva^{1,2}, Anastasiya V. Meleshko^{1,2}

1 – Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «MIREA – Russian Technological University», 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia
2 – JSC «Institute of Pharmaceutical Technologies», 21/1, Skolkovskoye highway, Moscow, 121353, Russia

*Corresponding author: Yuliya M. Domnina. E-mail: domnina.yulia@mail.ru

Received: 03.02.2020. Accepted: 18.03.2020

Abstract

Introduction. Naltrexone, an antagonist of μ -opioid receptors, is promising for the treatment of various autoimmune and oncological diseases when used in doses of 1.5–5 mg/day. To date, there are no medications that provide such dosages of naltrexone.

Aim. Development and validation of a method for the quantitative determination of naltrexone hydrochloride in a nasal spray by high performance liquid chromatography (HPLC).

Materials and methods. As an object of research, a naltrexone hydrochloride nasal spray was used. The quantitative determination of naltrexone in the test sample was developed using a Dionex UltiMate 3000 high-performance liquid chromatograph (Thermo Scientific, USA) equipped with a diode-matrix detector.

Results and discussion. The possibility of using isocratic and gradient chromatographic modes for the quantitative determination of naltrexone hydrochloride in the nasal spray was studied. Based on these results, a new method of determination using the gradient mode is proposed, which allows minimizing the influence of the polymer component in the test sample on the analysis results.

© Домнина Ю. М., Суслов В. В., Кедик С. А., Ворфоломеева Е. В., Мелешко А. В., 2020

© Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Vorfolomeeva E. V., Meleshko A. V., 2020

Conclusion. A new technique of high-performance liquid chromatography (HPLC) is proposed that allows identification and quantification of naltrexone hydrochloride in a nasal spray containing a high concentration of water-soluble heat-sensitive poloxamer as a thickener. The developed method was validated according to the parameters: correctness, precision, specificity, linearity.

Keywords: nasal spray, naltrexone, high-performance liquid chromatography, validation, gradient mode.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors took an active part in the development of the experiment, analysis of the data obtained, writing the text of the article and its discussion.

For citation: Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Vorfolomeeva E. V., Meleshko A. V. Quantitative determination of naltrexone hydrochloride in a nasal spray by high-performance liquid chromatography. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 98–104.

ВВЕДЕНИЕ

Налтрексон – опиоидный антагонист с наибольшим сродством к μ -рецепторам [1] был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для медикаментозного лечения алкоголизма или расстройств, связанных с употреблением опиоидов [2]. Впоследствии, после первоначального использования доктором Бихари налтрексона в дозах от 1,5 мг до 5 мг в качестве вспомогательной терапии при синдроме приобретенного иммунодефицита (СПИД) в клиническую практику для терапии аутоиммунных заболеваний была введена низкая доза налтрексона (НДН) [3, 4]. Однако, несмотря на это, до настоящего времени, лекарственные препараты, обеспечивающие такие дозировки налтрексона, отсутствуют. В связи с этим, нами был разработан состав назального спрея налтрексона гидрохлорида [5]. Одной из важных особенностей спрея является наличие в его составе водорастворимого термочувствительного полимера – полоксамера Kolliphor® P 407, загустевающего при повышении температуры, что должно предотвращать самопроизвольное вытекание препарата из полости носа.

В связи со сложностью состава лекарственной формы, из существующих методов применимых для количественного определения налтрексона [6–9], наиболее перспективным методом для анализа лекарственной формы является высокоэффективная жидкостная хроматография.

Цель данной работы заключалась в разработке и валидации методики количественного определения налтрексона гидрохлорида в назальном спрее методом ВЭЖХ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Для анализа использовали назальный спрей налтрексона, состав которого представлен в таблице 1.

Таблица 1. Состав назального спрея

Table 1. The composition of the nasal spray

Компоненты	Производитель	Концентрация, %
Налтрексона гидрохлорид	Aspenn Oss B.V., Нидерланды, серия L00037915	2,5
Полоксамер Kolliphor® P 407	Geismar США, № GNA 18721 D, NF-USP/ Ph. Eur.	14,0
Лимонная кислота безводная, х.ч.	Химмед, Россия	0,01
Натрия хлорид, х.ч.	Химмед, Россия	0,2
Бензалкония хлорид	Unilab chemicals and pharmaceuticals Pvt. Ltd., India, USP	0,006
Вода очищенная (ФС.2.2.0020.15)		До 100

Оборудование

Высокоэффективный жидкостный хроматограф «Dionex UltiMate 3000» (Thermo Scientific, США) оснащенный диодно-матричным детектором.

Установка для фильтрования Millipore (Merck, США).

Стерилизатор паровой ВК-75-1 (ТЗМОИ, Россия).

Используемые реактивы

Налтрексона гидрохлорид, субстанция-порошок (Aspenn Oss B.V., Нидерланды, серия L00037915, годен до 09.06.2020 г.), 1-пентилсульфонат натрия (Panreac, кат. № 245-208-4), ортофосфорная кислота (Fluka, кат. № 79606), ацетонитрил (Panreac, HPLC-gradient grade, кат. № 200-835-2).

Метод ВЭЖХ

Приготовление подвижной фазы А: в мерную колбу вместимостью 1000 мл количественно переносили навеску 0,870 г натрия 1-пентилсульфоната. Затем прибавляли 10 мл кислоты ортофосфорной 85 % и доводили раствор до метки водой для хроматографии. Полученный раствор отфильтровывали с помощью вакуумного насоса через мембранный фильтр из поливинилиденфторида с размером пор 0,45 мкм.

В качестве подвижной фазы В использовали ацетонитрил для хроматографии.

Приготовление растворителя [начальной подвижной фазой (A : B = 86 : 14 %) об./об]: в емкость вместимостью 1000 мл помещали 860 мл подвижной фазы А и 140 мл подвижной фазы В и перемешивали.

Приготовление раствора налтрексона для анализа: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 62,5 мг (точная навеска) налтрексона гидрохлорида, растворяли начальной подвижной фазой (A : B = 86 : 14 % об./об.), доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. Затем 2,5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили тем же растворителем до метки и перемешивали.

Приготовление раствора назального спрея для анализа: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 0,5 мл назального спрея, объем раствора доводили до метки раствором начальной подвижной фазы и перемешивали.

Приготовление раствора плацебо: в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 14,0 г полоксамера Kolliphor® P 407, 0,01 г лимонной кислоты безводной, 0,2 г натрия хлорида, 0,006 г бензалкония хлорида приливали 70 мл холодной воды очищенной и оставляют при постоянном перемешивании при температуре +4 – +7 °С на 5–6 часов. Затем доводили до метки водой очищенной и перемешивали.

Приготовление раствора плацебо для анализа: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 0,5 мл раствора плацебо, доводили до метки раствором начальной подвижной фазы и перемешивали.

Приготовление раствора назального спрея подвергнутого воздействию высокой температуры: в пенициллиновый флакон помещали 20 мл назального спрея, закупоривали резиновой пробкой снабженной алюминиевым колпачком, флакон помещали в автоклав и нагревали до 120–122 °С при давлении 120 кПа, выдерживали в течение 15 минут и охлаждали.

Условия хроматографирования

Колонка: Phenomenex Kinetex XB C18 250 × 4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм, размер пор 100 Å:

- скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин;
- длина волны детектирования 230 нм;
- температура колонки 25 °С;
- вводимый объем испытуемого образца 10,0 мкл.

Элюирование проводилось в градиентном режиме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Первоначальная попытка использовать условия хроматографирования, предложенные в ранее разработанной методике [9], оказалась неудачной. На хроматограмме образца спрея (рисунок 1) в отличие от хроматограммы раствора налтрексона (рисунок 2) наблюдается проявление дополнительных пиков. Это, вероятно, обусловлено блокировкой водораствори-

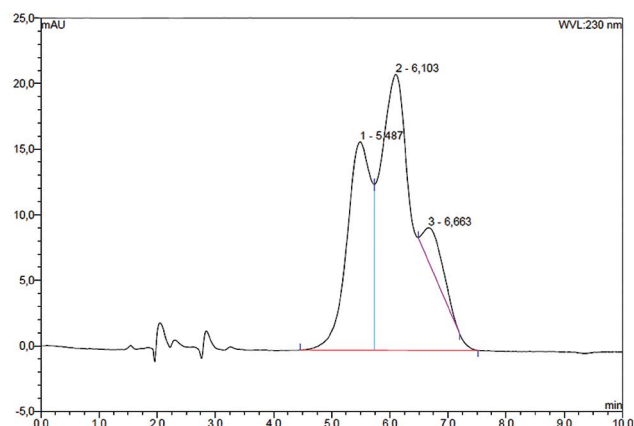


Рисунок 1. Хроматограмма испытуемого раствора спрея налтрексона гидрохлорида

Figure 1. Chromatogram of naltrexone hydrochloride spray test solution

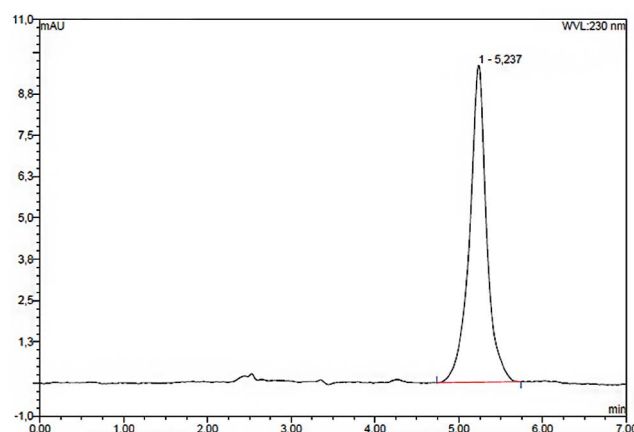


Рисунок 2. Хроматограмма раствора налтрексона гидрохлорида

Figure 2. Chromatogram of naltrexone hydrochloride solution

мым полоксамером активных центров сорбента колонки и как следствие ступенчатой десорбции определяемого компонента – налтрексона.

Для предотвращения данного эффекта нами были исследованы три градиентных режима элюирования (таблица 2) с использованием ион-парного реагента 1-пентилсульфонат натрия.

В первом режиме градиента (рисунок 3) в течение 20 минут возрастает элюирующая сила растворителя, активный компонент определяется на 11 минуте, но пик имеет неудовлетворительную асимметрию, так как активный компонент неэффективно сорбируется на колонке.

Замена формы градиента с линейной на ступенчатую (режим 2, рисунок 4) также не позволила провести корректное определение содержания налтрексона. Наблюдаемый с пятой по восьмую минуту при 70 % органической фазы пик налтрексона является малоэффективным. В тоже время, наблюдается подъем базовой линии, затрудняющий его интегрирование.

Таблица 2. Режимы градиентного элюирования

Table 2. Gradient Elution Modes

Режим 1		Режим 2		Режим 3 (Выбранная методика)	
Интервал, мин	Подвижная фаза Б, % об	Интервал, мин	Подвижная фаза Б, % об	Интервал, мин	Подвижная фаза Б, % об
0	10	0–4	15	0–7	14
0–20	30	4–5	15→70	7–13	14→60
20–21	30→10	5–8	70	13–20	60→90
21–30	10	8–9	70→15	20–21	90→14
		9–17	15	21–26	14

В третьем режиме (рисунок 5) применяли двойной ступенчатый градиент. Сорбция налтрексона осуществлялась при возрастании элюирующей силы с 14 % до

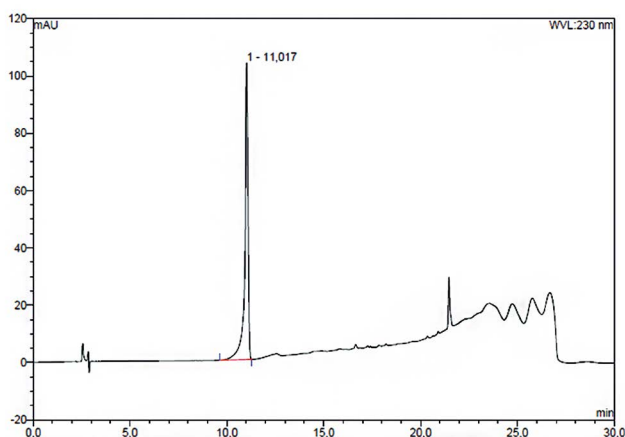


Рисунок 3. Хроматограмма испытуемого раствора спрея налтрексона гидрохлорида (режим 1)

Figure 3. Chromatogram of test solution of naltrexone hydrochloride spray (mode 1)

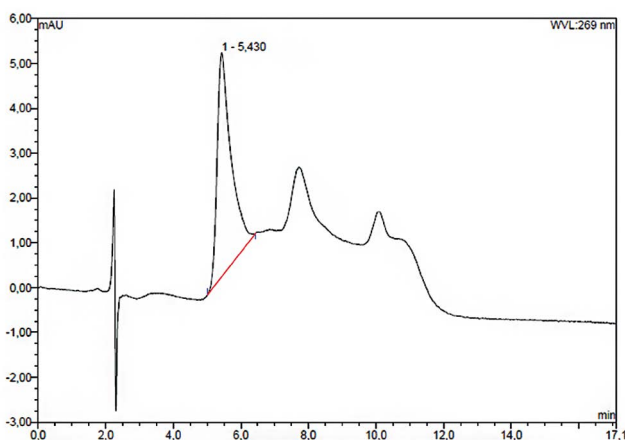


Рисунок 4. Хроматограмма испытуемого раствора спрея налтрексона гидрохлорида (режим 2)

Figure 4. Chromatogram of test solution of naltrexone hydrochloride spray (mode 2)

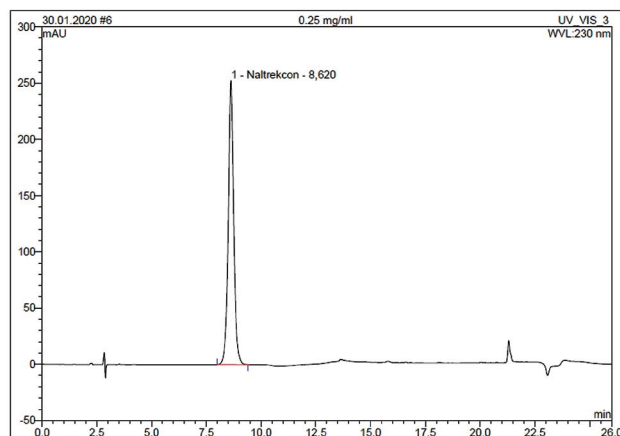


Рисунок 5. Хроматограмма испытуемого раствора спрея налтрексона гидрохлорида (режим 3)

Figure 5. Chromatogram of test solution of naltrexone hydrochloride spray (mode 3)

60 %, при дальнейшем увеличении фазы В с 60 % до 90 % происходит удаление полуксамера с поверхности сорбента.

Для определения налтрексона в составе назального спрея выбрали режим № 3. Данный режим можно варьировать при условии выполнения теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Она включает в себя:

- фактор асимметрии (A_s) для пика налтрексона на хроматограммах стандартного раствора должен находиться в диапазоне от 0,8 до 1,5;
- среднее квадратичное отклонение площадей пиков налтрексона на пяти хроматограммах стандартного раствора составляет не более 3 %.

Валидацию методики количественного определения налтрексона в назальном спрее проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV [10].

Специфичность подтверждали на основе сравнения результатов хроматографирования растворителя (рисунок 6), раствора назального спрея, не содержа-

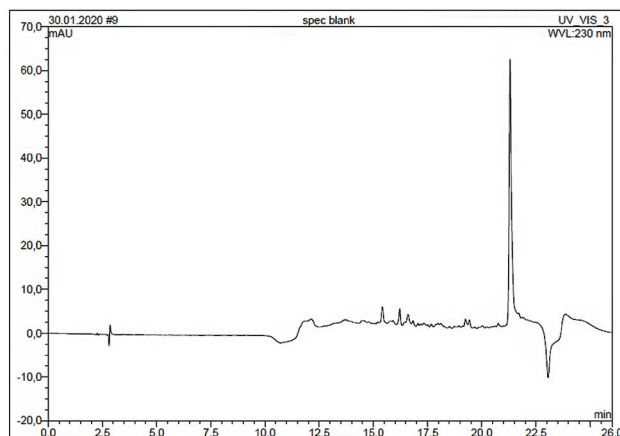


Рисунок 6. Хроматограмма растворителя

Figure 6. Chromatogram of solvent

щего налтрексона гидрохлорида («плацебо») (рисунок 7), раствора налтрексона гидрохлорида для анализа (рисунок 8), раствора назального спрея для анализа (рисунок 9) и раствора назального спрея подвергнутого воздействию высокой температуры (рисунок 10).

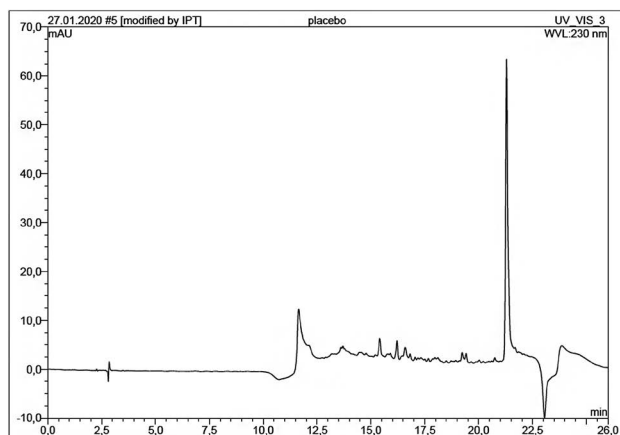


Рисунок 7. Хроматограмма «плацебо»

Figure 7. Chromatogram of placebo

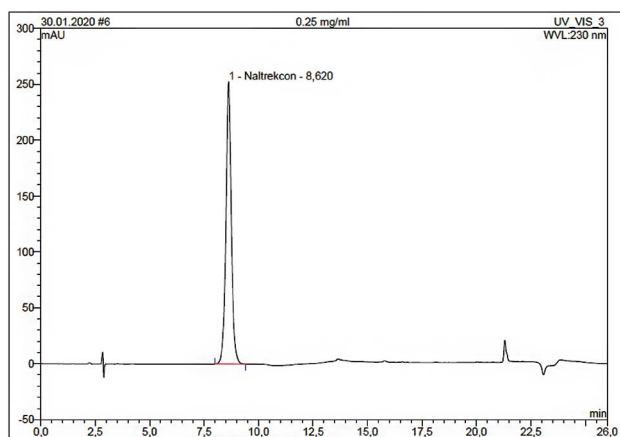
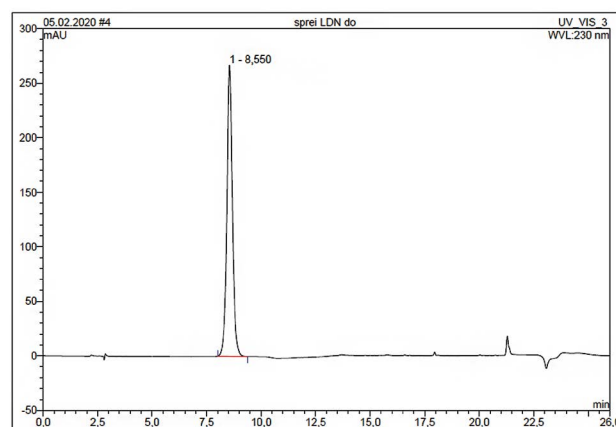


Рисунок 8. Хроматограмма раствора налтрексона гидрохлорида для анализа

Figure 8. Chromatogram of naltrexone hydrochloride solution

На представленных выше хроматограммах растворителя и «плацебо» (рисунки 6 и 7) отсутствуют пики, мешающие определению налтрексона гидрохлорида. Пик, соответствующий налтрексону гидрохлориду на хроматограмме, анализируемого образца назального спрея (рисунок 9), имеет такое же время удерживания, как пик на хроматограмме раствора налтрексона гидрохлорида для анализа (рисунок 8).

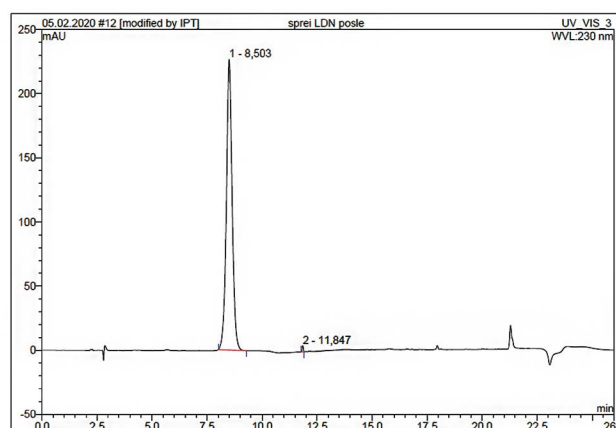
На хроматограмме раствора назального спрея, подвергнутого воздействию высокой температуры (рисунок 10), наблюдается уменьшение площади пика налтрексона гидрохлорида на 8,5 минуты и дополнительный пик на 11,8 минуты, образующейся в результате нагревания примеси. Пик, соответствующий



No.	Ret. Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU · min	Rel. Area %	Amount	Type
1	8.55	n.a.	266.987	77.237	100.00	n.a.	BMB
Total:			266.987	77.237	100.00	0.000	

Рисунок 9. Хроматограмма анализируемого образца назального спрея

Figure 9. Chromatogram of the test sample of the nasal spray



No.	Ret. Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU · min	Rel. Area %	Amount	Type
1	8.50	n.a.	226.613	67.800	99.63	n.a.	BMB
2	11.85	n.a.	4.812	0.254	0.37	n.a.	BMB*
Total:			231.425	68.054	100.00	0.000	

Рисунок 10. Хроматограмма раствора назального спрея, подвергнутого воздействию высокой температуры

Figure 10. Chromatogram of nasal spray solution exposed to high temperature

щий примеси, не мешает определению налтрексона гидрохлорида.

Прецизионность оценивали по параметрам повторяемость (сходимость) и внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность (таблицы 3 и 4).

Относительное стандартное отклонение (RSD) не должно превышать 4,0 %. Требования критерия прецизионность по параметру повторяемости выполнены.

Исследование параметра «Прецизионность по критерию внутрилабораторная воспроизводимость» было выполнено двумя сотрудниками независимо друг от друга на разных сериях препарата (таблица 4).

Таблица 3. Статистические характеристики валидируемой методики по параметру повторяемость (сходимость)

Table 3. Statistical characteristics of the validated method for the repeatability (convergence) parameter

№	A, mAUxмин	C, мг/мл	Среднее	Стандартное отклонение, s	Относительная погрешность ε, %	Доверительный интервал	RSD, %
1	80,21	0,250	0,251	0,0002	0,084	0,251 ± 0,000	0,080
2	80,19	0,251					
3	80,26	0,251					
4	80,26	0,251					
5	80,28	0,251					
6	80,36	0,251					

Относительное стандартное отклонение (RSD) по результатам измерений в течение двух дней должно составлять не более 4,0 %. Критерий Фишера составил 0,138 %, что не превышает требуемый диапазон не более 5,05 %. Требования критерия прецизионность по параметру внутрилабораторной воспроизводимости выполнены.

Необходимым условием пригодности методики количественного определения активного компонента является наличие линейной зависимости площади пика от концентрации. Экспериментально полученные точки описываются уравнением прямой $y = 18005x + 292,68$ с коэффициентом корреляции $r = 0,994$. Величина коэффициента корреляции более 0,99, что удовлетворяет требованиям критерия «Линейность». На рисунке 11 представлено графическое отображение зависимости площади пика от концентрации.

Таблица 4. Статистические характеристики валидируемой методики по параметру внутрилабораторная воспроизводимость

Table 4. Statistical characteristics of the validated method for the parameter intralaboratory reproducibility

№	A, mAUxмин	C, мг/мл	Среднее	Стандартное отклонение, s	Относительная погрешность ε, %	Доверительный интервал	RSD, %
Сотрудник А	1 80,21	0,250	0,251	0,0002	0,084	0,251 ± 0,000	0,080
	2 80,19	0,251					
	3 80,26	0,251					
	4 80,26	0,251					
	5 80,28	0,251					
	6 80,36	0,251					
Сотрудник Б	1 81,27	0,255	0,255	0,0002	0,077	0,255 ± 0,000	0,073
	2 80,27	0,255					
	3 81,25	0,254					
	4 81,28	0,255					
	5 81,40	0,255					
	6 81,33	0,255					

Правильность методики оценивали при помощи растворов с заданным уровнем концентраций налтрексона гидрохлорида, сравнивая найденные значения с истинными (расчетным) данными (таблица 5).

Процент открываемости должен находиться в диапазоне 95–105 %; относительное стандартное отклонение (RSD) не более 4,0 %.

Робастность (устойчивость) методики оценивали по двум параметрам: влияние температуры колонки и концентрации ион-парного реагента в подвижной фазе. При изменении температуры $\pm 5^\circ\text{C}$ не происходит значительных изменений измеряемых парамет-

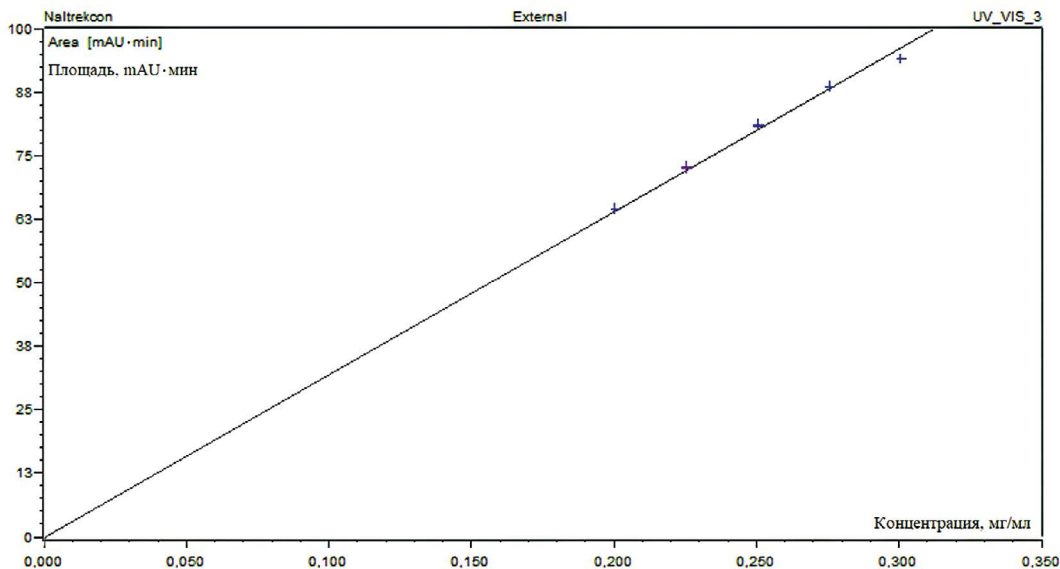


Рисунок 11. Графическое отображение параметра «Линейность»

Figure 11. Graphical display of the Linearity parameter

ров. При увеличении температуры на 10 °C и более происходит уменьшение времени удерживания активного компонента (рисунок 12).

Таблица 5. Статистические характеристики валидируемой методики по параметру правильность

Table 5. Statistical characteristics of the validated method for the correctness parameter

Уровень концентрации, %	A, mAUxмин	Найдено С, мг/мл	Среднее	RSD, %	Процент открываемости, %
80	64,74	0,199	0,200	0,10	99,83
	64,77	0,200			
	64,86	0,200			
100	81,05	0,254	0,254	0,28	101,67
	81,40	0,255			
	81,02	0,254			
120	64,09	0,297	0,298	0,32	99,44
	94,64	0,299			
	94,48	0,299			

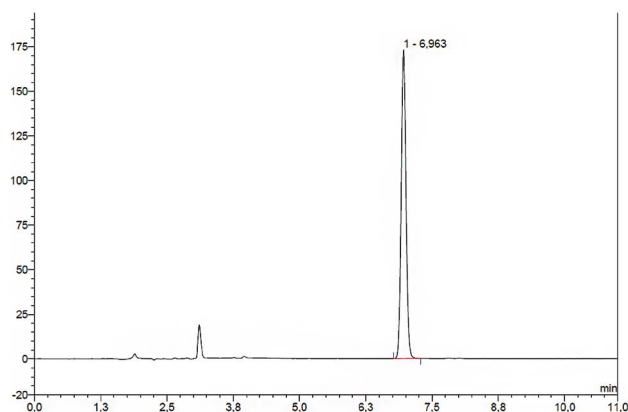


Рисунок 12. Хроматограмма испытуемого раствора при термостатировании колонки при 35

Figure 12. Chromatogram of the test solution during column temperature control at 35

Таким образом, методика устойчива в температурном диапазоне от 20 до 30 °C. При уменьшении концентрации ион-парного реагента до 4 ммоль/л также происходит уменьшение времени удерживания определяемого компонента (рисунок 13), ввиду образования меньшего количества ионных пар на поверхности сорбента.

В диапазоне концентраций ион-парного реагента 4,5–5,5 ммоль/л разработанная методика устойчива.

Полученные расчетные и экспериментальные значения, полностью удовлетворяли предъявленным критериям, что позволяет сделать заключение о корректности применения методики количественного определения налтрексона в препарате «Налтрексон гидрохлорид, спрей назальный».

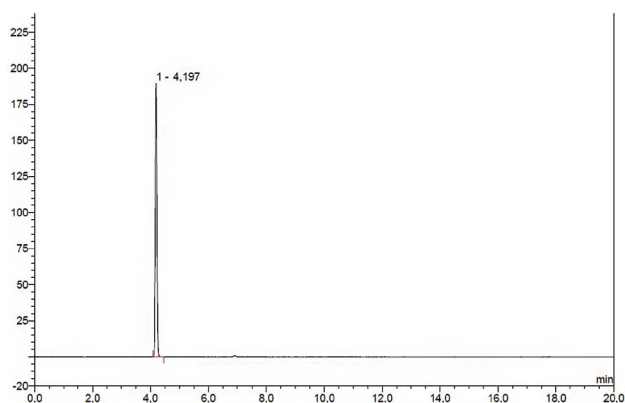


Рисунок 13. Хроматограмма испытуемого раствора при концентрации ион-парного реагента 4 ммоль/л

Figure 13. Chromatogram of the test solution at an ion-pair reagent concentration of 4 mmol/L

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика, позволяет с высокой точностью осуществлять идентификацию и определять количественное содержание налтрексона гидрохлорида в назальном спрее, содержащем полноксаметр в высокой концентрации.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Schumacher M., Basbaum A., Ramana N. Opioid Agonists & Antagonists. In Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 13th ed. Wiley: Hoboken, USA. 2014: 531.
- Sudakin D. Naltrexone: not just for opioids anymore. *Journal of Medical Toxicology*. 2016; 12(1): 71–75.
- Schopick J. Bernard Bihari, MD: low-dose naltrexone for normalizing immune system function. *Alternative therapies in health and medicine*. 2013; 19(2): 56.
- Li Z. et al. Low-dose naltrexone (LDN): A promising treatment in immune-related diseases and cancer therapy. *International immunopharmacology*. 2018; 61: 178–184.
- Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Shnyak E. A. Rationale for the selection of auxiliary components for the naltrexone hydrochloride nasal spray. *Drug development & registration*. 2018; 4: 73–77 (in Russ.).
- Rezazadeh M., Yamini Y., Seidi S. Electromembrane extraction of trace amounts of naltrexone and nalmeferine from untreated biological fluids. *Journal of Chromatography B*. 2011; 879(15–16): 1143–1148.
- Valiveti S. et al. Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantitation of naltrexone and 6β-naltrexol in guinea pig plasma. *Journal of Chromatography B*. 2004; 810(2): 259–267.
- Clavijo C. et al. An automated, highly sensitive LC-MS/MS assay for the quantification of the opiate antagonist naltrexone and its major metabolite 6β-naltrexol in dog and human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2008; 874(1–2): 33–41.
- Moreno-Vicente R. et al. Development and validation of a bioanalytical method for the simultaneous determination of heroin, its main metabolites, naloxone and naltrexone by LC-MS/MS in human plasma samples: Application to a clinical trial of oral administration of a heroin/naloxone formulation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015; 114: 105–112.
- Petrova E. A. Development of the composition and technology for producing an injectable dosage form of naltrexone with a modified release. Diss. ... Ph.D. – M.: 2014: 147 (in Russ.).
- Sarsambi P. S. et al. Reverse phase-HPLC method for the analysis of naltrexone hydrochloride in bulk drug and its pharmaceutical formulations. *Pharm. Lett*. 2010; 2: 294–299.

Уверенный анализ сложных полярных соединений

Колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC



Хроматография гидрофильных взаимодействий (HILIC) позволяет удерживать и разделять полярные соединения с помощью стандартной системы ВЭЖХ и обычных растворителей для обращенно-фазового режима разделения.

Новые сорбенты Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC объединяют в себе инновационные технологии частиц сорбента и привитых фаз и улучшают удерживание и форму пиков полярных аналитов. Это позволяет быстро и эффективно разделять сложные полярные соединения, несущие высокий заряд, и достигать великолепной аналитической чувствительности в режиме масс-спектрального детектирования при использовании совместимых с масс-спектральным детектированием элюентов.

Колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z

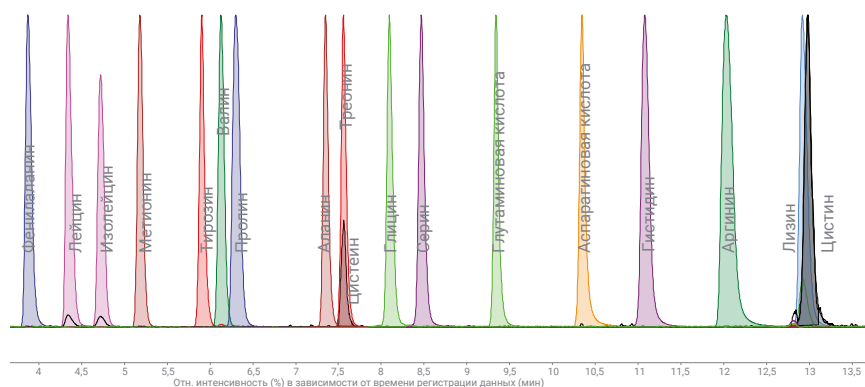
- Инновационная цвиттерионная неподвижная фаза, привитая на носитель Poroshell 120 с диаметром частиц 2,7 мкм.
- Вариант с колонкой с полиэфирэфиркетонным (ПЭЭК) покрытием обеспечивает великолепную форму пиков и успешное определение особо сложных заряженных соединений.
- Стабильность в условиях высокой температуры и pH: значение pH до 12 и температура до 80 °C.

Колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-ON5

- Инновационная полигидроксифруктановая неподвижная фаза, привитая на носитель Poroshell 120 с диаметром частиц 2,7 мкм.
- Имеет другую селективность по сравнению с фазами HILIC и HILIC-Z.

Отличное удерживание, форма пиков и аналитическая чувствительность. Разделение нефункционализированных аминокислот с помощью метода ВЭЖХ-МС

InfinityLab Poroshell HILIC-Z
2,1 x 100 мм, 2,7 мкм



Узнайте больше об удерживании и разделении полярных соединений

Закажите набор вводной документации, включающий методические рекомендации, брошюру о линейке продуктов Agilent InfinityLab Poroshell и многое другое:

www.agilent.com/chem/poroshell-120

Условия

Подвижная фаза A: 20 mM водный раствор формиата аммония, pH 3
Подвижная фаза B: ацетонитрил/20 mM водный раствор формиата аммония, pH 3, в соотношении 9:1

Градиент: от 100% B до 70% B в течение 10 мин, возврат к 100% B

Скорость потока: 0,8 мл/мин
Температура: 30 °C

Масс-спектральное детектирование: Трехквadrупольный масс-спектрометр Agilent, режим мониторинга выбранных ионов MS2 SIM

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-106-112>
УДК 615.012.8



Оригинальная статья/Research article

Разработка состава и технологии гранулированной лекарственной формы на основе густого экстракта расторопши пятнистой и адеметионина

Д. И. Писарев^{1*}, О. О. Новиков¹, Е. Т. Жиликова², Н. Н. Бойко², Р. А. Абрамович¹,
О. Г. Потанина¹, С. Лазар¹, А. Сайд Ахмад¹, Р. Нассер¹

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

2 – Белгородский государственный национальный исследовательский университет (НИУ «БелГУ»), 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

*Контактное лицо: Писарев Дмитрий Иванович. E-mail: juniper05@mail.ru

ORCID: Д. И. Писарев – <https://orcid.org/0000-0002-2996-7712>; О. О. Новиков – <https://orcid.org/0000-0003-3145-6783>; Е. Т. Жиликова – <https://orcid.org/0000-0002-4701-7753>; Н. Н. Бойко – <https://orcid.org/0000-0001-9222-2935>; Р. А. Абрамович – <https://orcid.org/0000-0003-1784-881X>; О. Г. Потанина – <https://orcid.org/0000-0002-0284-419X>; С. Лазар – <https://orcid.org/0000-0002-9339-1180>.

Статья получена: 23.03.2020. Статья принята к печати: 13.05.2020

Резюме

Введение. Создание рациональных комбинированных лекарственных средств, обладающих гепатопротекторной активностью – актуальная задача лекарствоведения. Адеметионин проявляет фармакологическую эффективность при цитолизе, холестазах, синтетической недостаточности. Силибин, в свою очередь, эффективен при цитолизе, синтетической недостаточности, мезенхимальном воспалении, фиброзе и патологической регенерации. Таким образом, комбинация данных веществ охватывает практически весь набор клинико-морфологических синдромов поражения печени и обладает широким спектром воздействия при различных патологиях печени.

Цель. Разработка комбинированной гранулированной лекарственной формы, содержащей густой экстракт расторопши пятнистой, адеметионин и аналитическое обеспечение настоящего процесса.

Материалы и методы. Для получения густого экстракта из плодов *Silybum marianum* L. использовали традиционный метод перколяции в батарее из 3 диффузоров. Удаление экстракта проводили с помощью ротационного испарителя ИР-1МЗ под вакуумом. Модельный образец гранул получали методом влажного гранулирования. Формирование гранул осуществлялось с помощью продавливания увлажненной массы через перфорированную поверхность. Для анализа силибина в полученном густом экстракте из плодов *S. marianum* L. использовали метод ОФ ВЭЖХ. Валидационную оценку методики проводили по общепринятым параметрам.

Результаты и обсуждение. Была разработана модельная комбинированная лекарственная форма на основе густого экстракта *S. marianum* L. и адеметионина. В качестве вспомогательного агента вводилась лактоза. Оценка качества гранул проводили по общепринятым критериям. Методом ОФ ВЭЖХ определены валидационные параметры изготовленной лекарственной формы. Правильность и прецизионность определяли методом добавок в серии из 9 экспериментальных образцов гранул. Результаты определения линейности, прецизионности и правильности методики определения силибина и адеметионина в комбинированной модельной лекарственной форме показали корректные результаты.

Заключение. Разработана комбинированная гранулированная лекарственная форма, содержащая густой экстракт расторопши пятнистой, адеметионин. Проведено аналитическое обеспечение настоящего процесса с использованием метода ВЭЖХ. Осуществлены валидационные исследования разработанной методики. Область применения полученных результатов – практическая фармация. Дальнейшие исследования должны касаться проведения комплекса фармакологических тестов.

Ключевые слова: силибин, адеметионин, расторопша пятнистая, гранулы, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Е. Т. Жиликова, Н. Н. Бойко, Р. А. Абрамович, С. Лазар разработали комбинированную лекарственную форму, содержащую густой экстракт расторопши и адеметионин. Д. И. Писарев, О. О. Новиков и О. Г. Потанина провели валидацию методики, обработку данных и интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Программы 5-100.

Для цитирования: Писарев Д. И., Новиков О. О., Жиликова Е. Т., Бойко Н. Н., Абрамович Р. А., Потанина О. Г., Лазар С., Ахмад А. С., Нассер Р. Разработка состава и технологии гранулированной лекарственной формы на основе густого экстракта расторопши пятнистой и адеметионина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 106–112.

Development of the Composition and Technology of a Granular Dosage form Based on a Thick Milk Thistle Extract and Ademetionine

Dmitry I. Pisarev^{1*}, Oleg O. Novikov¹, Elena T. Zhilyakova², Nikolay N. Boyko², Rimma A. Abramovich¹,
Olga G. Potanina¹, Simon Lazar¹, Abdulrazak Sayed Ahmad¹, Raudas Nasser¹

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

2 – Belgorod National Research University, 85, Pobedy str., Belgorod, 308015, Russia

*Corresponding author: Dmitry I. Pisarev. E-mail: juniper05@mail.ru

ORCID: Dmitry I. Pisarev – <https://orcid.org/0000-0002-2996-7712>; Oleg O. Novikov – <https://orcid.org/0000-0003-3145-6783>; Elena T. Zhilyakova – <https://orcid.org/0000-0002-4701-7753>; Nikolay N. Boyko – <https://orcid.org/0000-0001-9222-2935>; Rimma A. Abramovich – <https://orcid.org/0000-0003-1784-881X>; Olga G. Potanina – <https://orcid.org/0000-0002-0284-419X>; Simon Lazar – <https://orcid.org/0000-0002-9339-1180>.

Received: 23.03.2020. Accepted: 13.05.2020

© Писарев Д. И., Новиков О. О., Жиликова Е. Т., Бойко Н. Н., Абрамович Р. А., Потанина О. Г., Лазар С., Ахмад А. С., Нассер Р., 2020

© Pisarev D. I., Novikov O. O., Zhilyakova E. T., Boyko N. N., Abramovich R. A., Potanina O. G., Lazar S., Ahmad A. S., Nasser R., 2020

Abstract

Introduction. The creation of rational combined medicines with hepatoprotective activity is an urgent task of medicinal science. Ademetionin shows pharmacological effectiveness in cytolysis, cholestasis, synthetic insufficiency. Silybin, in turn, is effective in cytolysis, synthetic insufficiency, mesenchymal inflammation, fibrosis and pathological regeneration. Thus, the combination of these substances covers almost the entire set of clinical and morphological syndromes of liver damage and has a wide range of effects in various liver pathologies.

Aim. The purpose of this study was to develop a combined granular dosage form containing a thick extract of milk thistle, ademetionin and analytical support for this process.

Materials and methods. To obtain a thick extract from the fruits of *Silybum marianum* L. a traditional percolation method was used in a battery of 3 diffusers. Extractant removal was performed using a rotary evaporator IR-1M3 under vacuum. For the analysis of silybin in the obtained thick extract from the fruit of *S. marianum* L. the method of HPLC was used. Validation evaluation of the method was performed according to generally accepted parameters.

Results and discussion. A modular combined dosage form based on a thick extract of *S. marianum* L. and ademetionine was developed. Lactose was introduced as an auxiliary agent. The quality of pellets was evaluated according to generally accepted criteria. The validation parameters of the manufactured dosage form were determined using the HPLC method. Accuracy and precision were determined by the method of additives in a series of 9 experimental samples of granules. The results of determining the linearity, precision and correctness of the method for determining silybin and ademetionin in a combined model drug form showed correct results.

Conclusion. Thus, a combined granular dosage form containing a thick extract of milk thistle, ademetionin, has been developed. Analytical support of this process using the HPLC method was performed. Validation studies of the developed methodology were carried out. The field of application of the obtained results is practical pharmacy. Further research should concern the conduct of a set of pharmacological tests.

Keywords: silybin, ademetionin, milk thistle, granules, high-performance liquid chromatography, validation.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Elena T. Zhilyakova, Nikolay N. Boyko, Rimma A. Abramovich, Simon Lazar, Abdulrazak Sayed Ahmad, Raudas Nasser developed a combined dosage form containing a thick extract of milk thistle and ademetionin. Dmitry I. Pisarev, Oleg O. Novikov and Olga G. Potanina conducted a validation of the methodology, data processing and interpretation of the results. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

Acknowledgment. This work was supported by Program 5-100.

For citation: Pisarev D. I., Novikov O. O., Zhilyakova E. T., Boyko N. N., Abramovich R. A., Potanina O. G., Lazar S., Ahmad A. S., Nasser R. Development of the composition and technology of a granular dosage form based on a thick milk thistle extract and ademetionine. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 106–112.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на отечественном фармацевтическом рынке преобладают гепатопротекторы растительного происхождения, содержащие суммарные фитокомплексы из плодов расторопши пятнистой – *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Плоды *S. marianum* L. характеризуются наличием богатого комплекса биологически активных веществ, включающего жирное масло, стерины, горечи, смолы, гетеро- и гомополисахариды и флавоноиды [1]. Однако наибольший интерес представляет уникальная группа – флаволигнаны [2, 3]. В плодах *S. marianum* L. было выделено 12 соединений данной группы, среди которых: силибин, изосилибин, 2,3-дегидросилибин, силандрин, силикрестин, силидианин, силимонин, 2,3-дегидросиликрестин, изосиликрестин, силигермин [4–7]. Доминирующими среди перечисленных соединений являются силибин, силидианин и силикрестин, сумма которых имеет общее название *силитарин* [8, 9]. На сегодняшний день лекарственные препараты на основе силитарина являются препаратами-лидерами в терапии заболеваний печени [10, 11].

Гепатопротекторную активность силитарина связывают с одним из его компонентов – силибином. Характерным свойством силибина является его предельно низкая токсичность при выраженной фармакологической активности [3, 12–14]. Ключевыми факторами, обеспечивающими гепатопротекторную активность

настоящего компонента, составляют четыре механизма действия:

- 1) антиоксидантный – обезвреживает активные формы кислорода и регулирует внутриклеточное содержание глутатиона [3]. Силибин повышает активность антиоксидантной защиты, в частности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы [11, 15];
- 2) мембраностабилизирующий – заключается в способности силибина стабилизировать мембраны гепатоцитов и, как следствие, повышать прочность мембран, предотвращая проникновение гепатотоксических агентов через клеточные мембраны, и снижать потерю внутриклеточных метаболитов [16]. Данный эффект является результатом взаимодействия силибина с мембранами гепатоцитов [12]. Силибин оказывает прямое влияние на клеточные мембраны, меняя их качественный состав. В клеточных мембранах увеличивается содержание жирных кислот и фосфолипидов, а содержание триглицеридов и эфиров холестерина в свою очередь снижается [17];
- 3) регенеративно-метаболический – под воздействием силибина происходит активация синтеза белка и регенерация гепатоцитов [18]. Данное свойство основано на способности силибина повышать содержание РНК и цРНК, и синтез рРНК в клетках печени [4]. Таким образом, увеличивается не только число рибосом, но и синтез белка в клетках [19];

4) ингибирование конверсии звёздчатых гепатоцитов в миофибробласты [20, 21].

Еще одним уникальным представителем группы гепатопротекторов является *адеметионин* (син.: S-аденозил-L-метионин, сульфаденозил-L-метионин, S-аденозилметионин). Данное соединение – производное серосодержащей незаменимой аминокислоты метионина и аденозинтрифосфата. Оно представляет собой активный метионин, который является донатором метильных групп в реакциях трансметилирования [22].

В настоящее время имеется множество результатов клинических исследований, доказывающих эффективность адеметионина при патологиях печени [23, 24].

Адеметионин проявляет фармакологическую эффективность при цитолизе, холестазе, синтетической недостаточности. Силибин, в свою очередь, эффективен при цитолизе, синтетической недостаточности, мезенхимальном воспалении, фиброзе и патологической регенерации [25]. Таким образом, можно сделать вывод о том, что комбинация данных веществ охватывает практически весь набор клинко-морфологических синдромов поражения печени и обладает широким спектром воздействия при различных патологиях печени [26].

Следовательно, создание рациональных комбинированных лекарственных средств, обладающих гепатопротекторной активностью, и аналитическое обеспечение процесса их разработки является актуальной задачей фармации.

Целью настоящего исследования, проводимого в рамках научного направления «Фармацевтический ремейк» [27], явилась разработка комбинированной гранулированной лекарственной формы, содержащей густой экстракт расторопши пятнистой, адеметионин и аналитическое обеспечение настоящего процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования выступили плоды *S. marianum* L. (ФС.2.5.0035.15), субстанция адеметионина (НД-42-4578-05), стандартный образец силибина (Sigma-Aldrich, CAS 22888-70-6, LOT # BCBS2989V, PCod: 101853895, Германия).

Хроматографические исследования проводили на хроматографическом приборе фирмы Agilent Technologies производства США, оснащённым детектором с диодной матрицей серии 1200 Infinity и обрабатывались с помощью программного обеспечения Agilent Chem Station.

Эффективность колонки (N), коэффициент разделения (R_s) и асимметрию пиков рассчитывали согласно рекомендациям Европейской фармакопеи [21].

Сумму флаволигнанов подвергали хроматографическому разделению в следующих условиях: подвижная фаза: 1,0%-ый водный раствор кислоты уксусной (А); спирт метиловый (Б) в градиентном режиме

элюирования, колонка: *Ascentis express* C₁₈, 100 × 4,6 мм; 2,7 мкм фирмы Supelco; скорость подвижной фазы – 0,5 мл/мин; температура колонки +35 °С; объём вводимой пробы 5 мкл; детекция диодно-матричная при длинах волн 290 и 257 нм.

Режим элюирования – градиентный.

Идентификацию изомеров силибина осуществляли по совпадению времён удерживания анализируемого образца со СО силибина.

Содержание силибина в густом экстракте определяли путём растворения 0,1 г указанного объекта в 25 мл спирта этилового 70%-ого. Полученные извлечение подвергали хроматографированию.

Расчёт содержания силибина в объектах проводили по формуле 1:

$$x = \frac{S_x \cdot C_{st} \cdot W \cdot P \cdot 100}{S_{ct} \cdot m_x \cdot B}, \quad (1)$$

где S_x – среднее значение площади пика анализируемого образца; S_{ct} – среднее значение площади пика СО силибина; m_{st} – масса навески СО силибина, г; m_x – масса навески сырья или экстракта, г; W – объём мерной колбы, мл; P – содержание основного вещества в СО силибина, %; B – потеря в массе при высушивании анализируемого образца, %.

Расчёт содержания силибина и адеметионина в гранулах проводили по формуле 2:

$$x = \frac{S_x \cdot m_{st} \cdot 100 \cdot 100}{S_{ct} \cdot m_x \cdot V_a \cdot (100 - W)}, \quad (2)$$

где S_x – среднее значение площадей пиков силибина или адеметионина, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора; S_{ct} – среднее значение площадей пиков силибина или адеметионина, вычисленное из хроматограмм раствора сравнения; m_{st} – масса навески СО силибина или адеметионина, г; m_x – масса навески исследуемого материала, г; V_a – объём раствора Б, введённый в хроматограф (в случае материалов природного происхождения – 5 мкл); W – потеря в массе при высушивании материала, г.

Полученные гранулы, содержащие густой экстракт плодов *S. marianum* L. и адеметионин, анализировали согласно соответствующим ОФС.1.4.1.0004.15, ОФС.1.1.0015.15, ОФС.1.4.2.0016.15 и ОФС.1.4.2.0016.15.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для количественной оценки силибина в сырье, промежуточном продукте – густом экстракте и гранулах использован метод абсолютной градуировки. Подтверждение линейности разрабатываемой методики проводили в диапазоне концентраций 0,01–0,1 % раствора СО силибина. По результатам хроматографирования построен градуировочный график зависимости площадей пиков изомеров силибина от концентрации. В выбранном диапазоне кон-

центраций калибровочная зависимость оказалась прямолинейной, уравнение регрессии имело вид: $y = 28108x - 105,22$.

Коэффициент корреляции $R^2 = 0,996$, что свидетельствует о прямо пропорциональном соотношении между концентрацией и аналитическим сигналом силибина.

Диапазон линейности для адеметионина составил 0,025–0,3 %. В указанном диапазоне калибровочная зависимость была прямолинейной, уравнение регрессии для адеметионина имела вид: $y = 49139x + 1035,9$.

Коэффициент аппроксимации составил 0,9902, что свидетельствует о прямолинейной зависимости между концентрацией и площадью пика адеметионина.

Для получения густого экстракта из плодов *S. marianum* L. использовали метод перколяции в батарее из 3 диффузоров. Удаление экстрагента проводили с помощью ротационного испарителя ИР-1МЗ под вакуумом.

Для анализа силибина в полученном густом экстракте из плодов *S. marianum* L. использовали метод ОФ ВЭЖХ.

Результаты хроматографирования спиртового раствора густого экстракта *S. marianum* L. представлены на рисунке 1.

На хроматограмме обнаруживаются два пика со временем удерживания $t_r = 36,707$ и $37,278$ мин с пометками площадей пиков, принадлежащие изомерам силибина.

Валидационную оценку методики проводили по общепринятым параметрам. Все валидационные критерии оказались корректными.

На следующем этапе настоящих исследований была разработана модельная комбинированная лекарственная форма на основе густого экстракта *S. marianum* L. и адеметионина.

В качестве вспомогательных веществ – наполнителей и формообразователей использовали лактозу. В качестве увлажнителя в модельном образце гранул, использовалась вода очищенная.

Модельный образец гранул получали методом влажного гранулирования. Формирование гранул осуществлялось с помощью продавливания увлажненной массы через перфорированную поверхность.

Состав модельной лекарственной формы: густой экстракт плодов *S. marianum* L. – 1,266 г; адеметионин – 0,4 г; лактоза моногидрат – 0,33 г.

Модельная смесь представляла собой зерна неправильной формы, желтого цвета и отвечала требованиям ОФС.1.4.1.0004.15 «Гранулы».

Результаты хроматографического изучения гранулированной модельной лекарственной формы на основе адеметионина и густого экстракта *S. marianum* L. представлены на рисунке 2.

Оценку качества гранул проводили по общепринятым критериям, результаты представлены в таблице 1.

Валидационную оценку настоящей методики проводили по общепринятым валидационным критериям.

Прецизионность (сходимость) и правильность методики определяли методом добавок на сериях, полученных из 9 образцов гранул. Результаты представлены в таблицах 2 и 3.

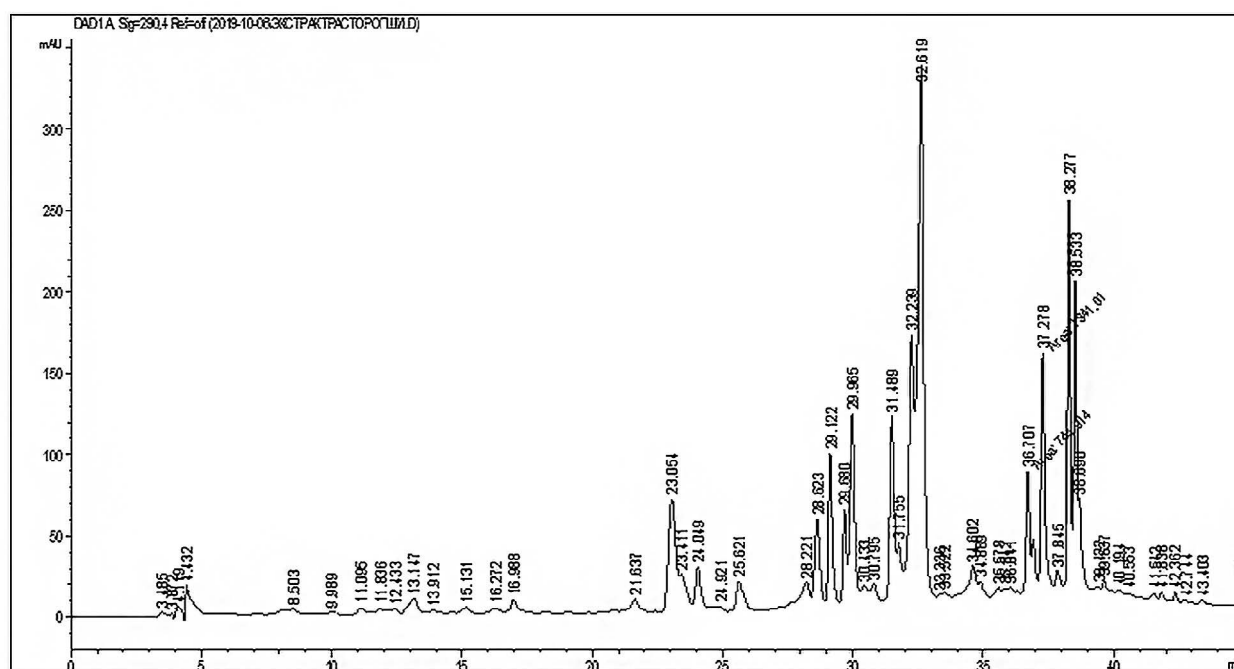
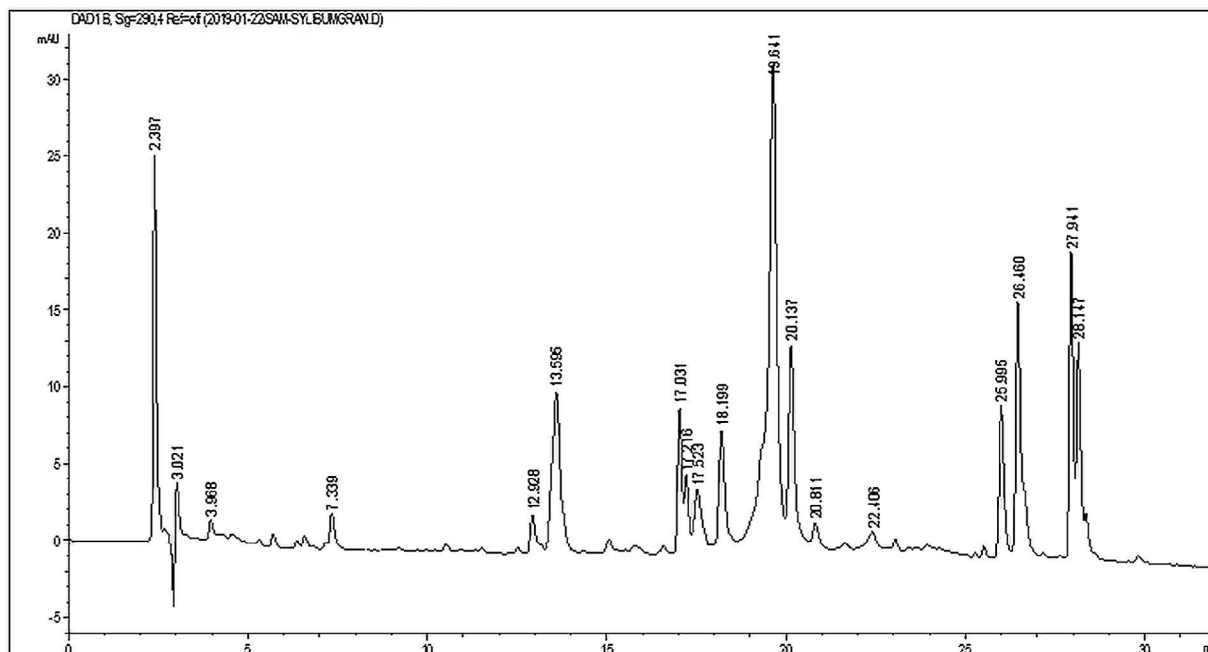
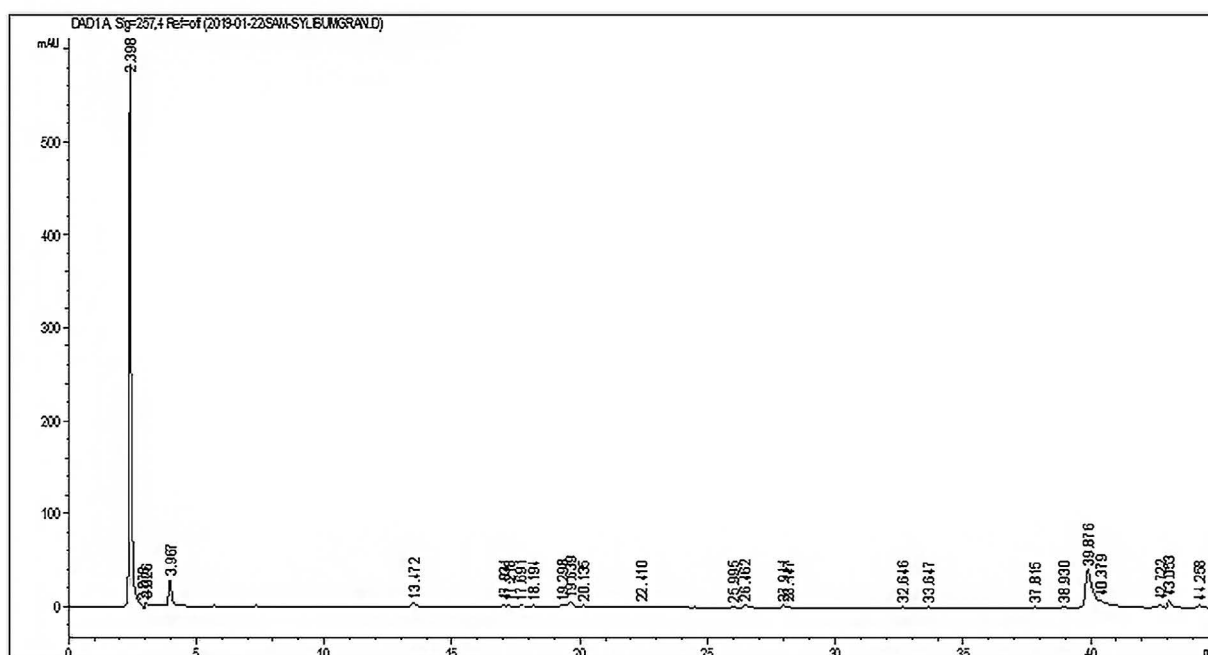


Рисунок 1. Хроматограмма густого экстракта из плодов *S. marianum* L.

Figure 1. Chromatogram of a thick extract from the fruit of *S. marianum* L.



А



Б

Рисунок 2. Хроматограмма гранул с густым экстрактом *S. marianum* L. и адеметионином:

А – детекция диодно-матричная при $\lambda = 290$ нм; Б – детекция диодно-матричная при $\lambda = 257$ нм

Figure 2. Chromatogram of granules with a thick extract of *S. marianum* L. and ademethionine:

А – diode-matrix detection at $\lambda = 290$ nm; Б – diode-matrix detection at $\lambda = 257$ nm

Содержание силибина в плодах *S. marianum* L. составило $0,048 \pm 0,27$ %. Ошибка единичного эксперимента при доверительной вероятности $P = 95$ % составила 0,7 %.

Содержание адеметионина в густом экстракте составило $0,4 \pm 0,487$ %. Относительная ошибка сред-

него результата при доверительной вероятности $P = 95$ % составила 1,25 %.

Результаты определения линейности, прецизионности и правильности методики определения силибина и адеметионина в комбинированной модельной лекарственной форме показали корректные результаты.

Таблица 1. Технологические характеристики гранул с экстрактом плодов *S. marianum* L. и адеметионином

Table 1. Technological characteristics of granules with *S. marianum* L. fruit extract and ademethionine

Показатель	Методика	Экспериментальные значения
Размер частиц	ОФС.1.1.0015.15	1,0–1,2 мм
Форма	ОФС.1.4.2.0014.15	Вытянутая
Насыпная плотность	ОФС.1.4.2.0016.15	563,70 ± 1,31 кг/м³
Сыпучесть	ОФС.1.4.2.0016.15	7,05 ± 0,25 г/с
Распадаемость	ОФС.1.4.2.0013.15	10 ± 3 минут
Прочность	ОФС.1.4.2.0004.15	97,91 ± 0,5 %
Высвобождение адеметионина	ОФС.1.4.2.0014.15	99,0 ± 0,10 % (30 минут)
Растворимость в воде	ОФС.1.2.1.0005.15	Умеренно растворимы (1:30)
Остаточная влажность	ОФС.1.2.1.0010.15	2,3 ± 0,6 %
Однородность дозирования	ОФС.1.4.2.0008.15	Выполняется
Содержание: силибина адеметионина	ОФ ВЭЖХ ОФ ВЭЖХ	Не менее 0,048 г Не менее 0,4 г

Таблица 2. Результаты опытов с добавками СО силибина для методики количественного определения силибина в гранулах

Table 2. The results of experiments with the addition of CO silybin for methods for the quantitative determination of silybin in granules

Взято, г	Добавлено СО, г	Введено, г	Найдено, г	Ошибка		Открываемость, %
				Абсолютная, %	Относительная, %	
0,0481	0,0122	0,0603	0,0602	–0,0001	0,166	99,83
0,0480	0,0124	0,0604	0,0606	+0,0002	0,33	100,33
0,0478	0,0123	0,0601	0,0602	+0,0001	0,166	100,166
0,0482	0,0243	0,0725	0,0723	–0,0002	0,41	99,59
0,0481	0,0245	0,0726	0,0728	+0,0002	0,27	100,27
0,0480	0,0242	0,0722	0,0725	+0,0003	0,41	100,41
0,0481	0,048	0,0961	0,096	–0,0001	0,10	99,9
0,0482	0,0478	0,096	0,0963	+0,0003	0,31	100,31
0,0479	0,0482	0,0961	0,0962	+0,0001	0,1	100,1
Среднее R, %						100,1
RSD, %						0,27
Относительный доверительный интервал $\Delta \% = t(95\%, n-1) \cdot RSD_z \% = 2,57 \cdot RSD_z \%$						0,6939
Систематическая погрешность, $\delta = Z_{cp} - 100$						0,1
Общий вывод о методике						Корректна

Таблица 3. Результаты опытов с добавками СО адеметионина для методики количественного определения адеметионина в гранулах

Table 3. The results of experiments with the addition of CO ademethionine for the quantitative determination of ademethionine in granules

Взято, г	Добавлено СО, г	Введено, г	Найдено, г	Ошибка		Открываемость, %
				Абсолютная, %	Относительная, %	
0,401	0,103	0,504	0,506	+0,002	0,39	100,39
0,400	0,102	0,502	0,505	+0,003	0,59	100,59
0,403	0,102	0,505	0,503	–0,002	0,4	99,6
0,404	0,203	0,607	0,606	–0,001	0,16	99,84
0,402	0,201	0,603	0,607	+0,004	0,65	100,65
0,403	0,203	0,606	0,601	–0,005	0,83	99,17
0,405	0,402	0,807	0,809	+0,002	0,4	100,4
0,402	0,402	0,804	0,805	+0,001	0,16	100,16
0,401	0,403	0,804	0,804	–	–	100,0
Среднее X, %						100,08
RSD, %						0,487
$\Delta \% = t(95\%, n-1) \cdot RSD_z \% = 2,57 \cdot RSD_z \%$						1,25
Систематическая погрешность, $\delta = Z_{cp} - 100$						0,08
Общий вывод о методике						Корректна

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выполнена разработка комбинированной гранулированной лекарственной формы, содержащей густой экстракт расторопши пятнистой, адеметионин. Проведено аналитическое обеспечение настоящего процесса с использованием метода ВЭЖХ. Осуществлены валидационные исследования разработанной методики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Науменко А. Г., Шевченко А. М. Выбор рациональной технологии получения сухого экстракта плодов расторопши пятнистой. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 1–2. Available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22328> (дата обращения: 09.06.2019).
2. Federico A., Dallio M., Loguercio C. Silymarin/silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. *Molecules*. 2017; 22: 191. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22020191>.
3. Ahmed-Belkacem A., Ahnou N., Barbotte L. Silybinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Gastroenterology*. 2010; 138: 1112–1122.
4. Biedermann D., Vavříková E., Cvak L., Křen V. Chemistry of silybin. *Natural Product Reports*. 2014; 31: 1138–1157.
5. Bijak M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.). Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules*. 2017; 22: 1942.
6. Calani L., Brighenti F., Bruni R., Del Rio D. Absorption and metabolism of milk thistle flavanolignans in humans. *Phytomedicine*. 2012; 20(1): 40–46.
7. Щекатикина А. С. Гепатопротекторные свойства флаволигнанов. *Труды Белорусского государственного университета*. 2009; 4(1): 27–48.
8. Thakare V. N., Aswar M. K., Kulkarni Y. P., Patil R. R., Patel B. M. Silymarin ameliorates experimentally induced depressive like behavior in rats: involvement of hippocampal BDNF signaling, inflammatory cytokines and oxidative stress response. *Physiol. Behav.* 2017; 1(179): 401–410.
9. Рахымжан Г. Ж., Аралбаева А. Н., Мурзахметова М. К. Оценка влияния фитопрепарата на биохимические показатели крови при

- экспериментальном гепатите. *On line scientific® educational Bulletin «Health and Education Millennium»*. 2016; 18(12): 26–30.
10. Ткач С. М. Эффективность и безопасность гепатопротекторов с точки зрения доказательной медицины. *Здоровье Украины*. 2009; 6: 7–10.
 11. Abenavoli L., Aviello G., Capasso R., Milic N., Capasso F. Milk thistle for non alcoholic fatty liver disease treatment. *Hepatitis Monthly*. 2011; 11: 173–177.
 12. Christodoulou E., Kechagia I. A., Tzimas S., Balafas E., Kostomitso-poulos N., Archontaki H., Dokoumetzidis A., Valsami G. Serum and tissue pharmacokinetics of silibinin after per os and i. v. administration to mice as a HP- β -CD lyophilized product. *Int. J. Pharm.* 2015; 493: 366–373.
 13. Kawaguchi Suzuki M., Frye R. F., Zhu H. J., Brinda B. J., Chavin K. D., Bernstein H. J., Markowitz J. S. The effects of milk thistle (*Silybum marianum*) on human cytochrome P450 activity. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014; 42: 1611–1616.
 14. Kim S. H., Oh D. S., Oh J. Y., Son T. G., Yuk D. Y., Jung Y. S. Silymarin prevents restraint stress induced acute liver injury by ameliorating oxidative stress and reducing inflammatory response. *Molecules*. 2016; 21: 443.
 15. Буторова Л. И., Цибилова Т. А., Калинин А. В. Возможности использования Легалона® при неалкогольной жировой болезни печени. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2010; 3: 85–91.
 16. Губергриц Н. Б., Фоменко П. Г., Лукашевич Г. М., Голубова О. А. Фармакотерапевтические эффекты и клинические возможности эталонного препарата силимарина. *Фарматека. Гастроэнтерология, гепатология*. 2012; 2(235): 24–31.
 17. Pradhan S. C., Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J. Med. Res.* 2006; 124(5): 491–504.
 18. Мехтиев С. Н., Мехтиева О. А., Смирнова М. Н. Фиброз печени как показание для терапии у больных хроническими гепатитами. *Эффективная фармакотерапия. Гастроэнтерология*. 2015; 1(2): 22–34.
 19. Венгеровский А. И., Огородова Л. М., Перевозчикова Т. В. Иммуномодулирующие свойства гепатопротекторов растительного происхождения при комбинированном применении с преднизолоном на модели токсического гепатита. *Растительные ресурсы*. 2004; 2: 107–113.
 20. Крепкова Л. В., Шкаренков А. А., Сокольская Т. А. Экспериментальное и клиническое изучение фитопрепаратов из расторопши пятнистой. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2008; 4: 36.
 21. Anstee Q. M., Day C. P. S-adenosylmethionine (SAME) therapy in liver disease: a review of current evidence and clinical utility. *J. Hepatol.* 2012; 57(5): 1097–109.
 22. Cederbaum A. I. Hepatoprotective effects of S-adenosyl-Lmethionine against alcohol- and cytochrome P450 2E1-induced liver injury. *World J. Gastroenterol.* 2010; 16(11): 1366–1376.
 23. Loguercio C., Andreone P., Brisc C. Silybin combined with phosphatidylcholine and vitamin E in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012; 52: 1658–1665.
 24. Kim E. J., Lee M. Y., Jeon Y. J. Silymarin inhibits morphological changes in LPS stimulated macrophages by blocking NF- κ B pathway. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*. 2015; 19: 211–8.
 25. Testino G. Silimarin and S-adenosyl-L methionine (SAME): two promising pharmacological agents in case of cronic alcoholic hepatothopathy. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 2013; 59(4): 341–356.
 26. Малютина А. Ю., Правлоцкая А. В., Новиков О. О., Писарев Д. И. Изучение компонентного состава полифенолов травы *Pentaphylloides fruticosa* L. *Фармация и фармакология*. 2018; 6(2). DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2018-6-2-135-150>.
 4. Biedermann D., Vavřiková E., Cvak L., Křen V. Chemistry of silybin. *Natural Product Reports*. 2014; 31: 1138–1157.
 5. Bijak M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.). Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules*. 2017; 22: 1942.
 6. Calani L., Brighenti F., Bruni R., Del Rio D. Absorption and metabolism of milk thistle flavanolignans in humans. *Phytomedicine*. 2012; 20(1): 40–46.
 7. Shchekatikhina A. S. Hepatoprotective properties of flavolignans. *Proceedings of the Belarusian state University*. 2009; 4(1): 27–48 (in Russ.).
 8. Thakare V. N., Aswar M. K., Kulkarni Y. P., Patil R. R., Patel B. M. Silymarin ameliorates experimentally induced depressive like behavior in rats: involvement of hippocampal BDNF signaling, inflammatory cytokines and oxidative stress response. *Physiol. Behav.* 2017; 1(179): 401–410.
 9. Rakhymzhan G. Zh., Aralbayeva A. N., Murzakhmetova M. K. Evaluation of the effect of phytopreparation on blood biochemical parameters in experimental hepatitis. *On line scientific® educational Bulletin «Health and Education Millennium»*. 2016; 18(12): 26–30 (in Russ.).
 10. Tkach S. M. Effectiveness and safety of hepatoprotectors from the point of view of evidence-based medicine. *Health of Ukraine*. 2009; 6: 7–10 (in Ukraine).
 11. Abenavoli L., Aviello G., Capasso R., Milic N., Capasso F. Milk thistle for non alcoholic fatty liver disease treatment. *Hepatitis Monthly*. 2011; 11: 173–177.
 12. Christodoulou E., Kechagia I. A., Tzimas S., Balafas E., Kostomitso-poulos N., Archontaki H., Dokoumetzidis A., Valsami G. Serum and tissue pharmacokinetics of silibinin after per os and i. v. administration to mice as a HP- β -CD lyophilized product. *Int. J. Pharm.* 2015; 493: 366–373.
 13. Kawaguchi Suzuki M., Frye R. F., Zhu H. J., Brinda B. J., Chavin K. D., Bernstein H. J., Markowitz J. S. The effects of milk thistle (*Silybum marianum*) on human cytochrome P450 activity. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014; 42: 1611–1616.
 14. Kim S. H., Oh D. S., Oh J. Y., Son T. G., Yuk D. Y., Jung Y. S. Silymarin prevents restraint stress induced acute liver injury by ameliorating oxidative stress and reducing inflammatory response. *Molecules*. 2016; 21: 443.
 15. Butorova L. I., Cibizova T. A., Kalinin A. V. The possibility of using Legalon® with nonalcoholic fatty liver disease. *Experimental and clinical gastroenterology*. 2010; 3: 85–91 (in Russ.).
 16. Gubergrits N. B. Pharmacotherapeutic effects and clinical capabilities of the reference drug Silymarin. *Pharmateka. Gastroenterology, Hepatology*. 2012; 2(235): 24–31 (in Russ.).
 17. Pradhan S. C., Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J. Med. Res.* 2006; 124(5): 491–504.
 18. Mekhtiev S. N., Mekhtieva O. A., Smirnova M. N. Liver fibrosis as an indication for therapy in patients with chronic hepatitis. *Effective pharmacotherapy. Gastroenterology*. 2015; 1(2): 22–34 (in Russ.).
 19. Vengerovsky A. I., Ogorodova L. M., Perevozchikova T. V. Immunomodulating properties of hepatoprotectors of plant origin in combined use with prednisone on the model of toxic hepatitis. *Plant resources*. 2004; 2: 107–113 (in Russ.).
 20. Krepkova L. V., Shkarenkov A. A., Sokolskaya T. A. Experimental and clinical study of phytopreparations from milk thistle. *Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2008; 4: 36 (in Russ.).
 21. Anstee Q. M., Day C. P. S-adenosylmethionine (SAME) therapy in liver disease: a review of current evidence and clinical utility. *J. Hepatol.* 2012; 57(5): 1097–109.
 22. Cederbaum A. I. Hepatoprotective effects of S-adenosyl-Lmethionine against alcohol- and cytochrome P450 2E1-induced liver injury. *World J. Gastroenterol.* 2010; 16(11): 1366–1376.
 23. Loguercio C., Andreone P., Brisc C. Silybin combined with phosphatidylcholine and vitamin E in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012; 52: 1658–1665.
 24. Kim E. J., Lee M. Y., Jeon Y. J. Silymarin inhibits morphological changes in LPS stimulated macrophages by blocking NF- κ B pathway. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*. 2015; 19: 211–8.
 25. Testino G. Silimarin and S-adenosyl-L methionine (SAME): two promising pharmacological agents in case of cronic alcoholic hepatothopathy. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 2013; 59(4): 341–356.
 26. Malyutina A. U., Pravlotskaya A. V., Novikov O. O., Pisarev D. I. Study of the component composition of polyphenols of the herb *Pentaphylloides fruticosa* L. *Pharmacy and pharmacology*. 2018; 6(2). DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2018-6-2-135-150> (in Russ.).

REFERENCE

1. Naumenko A. G., Shevchenko A. M. The Choice of rational technology for obtaining dry extract of milk thistle fruit. *Modern problems of science and education*. 2015: 1–2. Available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22328> (accessed 09.06.2019) (in Russ.).
2. Federico A., Dallio M., Loguercio C. Silymarin/silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. *Molecules*. 2017; 22: 191. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22020191>.
3. Ahmed-Belkacem A., Ahnou N., Barbotte L. Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Gastroenterology*. 2010; 138: 1112–1122.
4. Biedermann D., Vavřiková E., Cvak L., Křen V. Chemistry of silybin. *Natural Product Reports*. 2014; 31: 1138–1157.
5. Bijak M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.). Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules*. 2017; 22: 1942.
6. Calani L., Brighenti F., Bruni R., Del Rio D. Absorption and metabolism of milk thistle flavanolignans in humans. *Phytomedicine*. 2012; 20(1): 40–46.
7. Shchekatikhina A. S. Hepatoprotective properties of flavolignans. *Proceedings of the Belarusian state University*. 2009; 4(1): 27–48 (in Russ.).
8. Thakare V. N., Aswar M. K., Kulkarni Y. P., Patil R. R., Patel B. M. Silymarin ameliorates experimentally induced depressive like behavior in rats: involvement of hippocampal BDNF signaling, inflammatory cytokines and oxidative stress response. *Physiol. Behav.* 2017; 1(179): 401–410.
9. Rakhymzhan G. Zh., Aralbayeva A. N., Murzakhmetova M. K. Evaluation of the effect of phytopreparation on blood biochemical parameters in experimental hepatitis. *On line scientific® educational Bulletin «Health and Education Millennium»*. 2016; 18(12): 26–30 (in Russ.).
10. Tkach S. M. Effectiveness and safety of hepatoprotectors from the point of view of evidence-based medicine. *Health of Ukraine*. 2009; 6: 7–10 (in Ukraine).
11. Abenavoli L., Aviello G., Capasso R., Milic N., Capasso F. Milk thistle for non alcoholic fatty liver disease treatment. *Hepatitis Monthly*. 2011; 11: 173–177.
12. Christodoulou E., Kechagia I. A., Tzimas S., Balafas E., Kostomitso-poulos N., Archontaki H., Dokoumetzidis A., Valsami G. Serum and tissue pharmacokinetics of silibinin after per os and i. v. administration to mice as a HP- β -CD lyophilized product. *Int. J. Pharm.* 2015; 493: 366–373.
13. Kawaguchi Suzuki M., Frye R. F., Zhu H. J., Brinda B. J., Chavin K. D., Bernstein H. J., Markowitz J. S. The effects of milk thistle (*Silybum marianum*) on human cytochrome P450 activity. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014; 42: 1611–1616.
14. Kim S. H., Oh D. S., Oh J. Y., Son T. G., Yuk D. Y., Jung Y. S. Silymarin prevents restraint stress induced acute liver injury by ameliorating oxidative stress and reducing inflammatory response. *Molecules*. 2016; 21: 443.
15. Butorova L. I., Cibizova T. A., Kalinin A. V. The possibility of using Legalon® with nonalcoholic fatty liver disease. *Experimental and clinical gastroenterology*. 2010; 3: 85–91 (in Russ.).
16. Gubergrits N. B. Pharmacotherapeutic effects and clinical capabilities of the reference drug Silymarin. *Pharmateka. Gastroenterology, Hepatology*. 2012; 2(235): 24–31 (in Russ.).
17. Pradhan S. C., Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J. Med. Res.* 2006; 124(5): 491–504.
18. Mekhtiev S. N., Mekhtieva O. A., Smirnova M. N. Liver fibrosis as an indication for therapy in patients with chronic hepatitis. *Effective pharmacotherapy. Gastroenterology*. 2015; 1(2): 22–34 (in Russ.).
19. Vengerovsky A. I., Ogorodova L. M., Perevozchikova T. V. Immunomodulating properties of hepatoprotectors of plant origin in combined use with prednisone on the model of toxic hepatitis. *Plant resources*. 2004; 2: 107–113 (in Russ.).
20. Krepkova L. V., Shkarenkov A. A., Sokolskaya T. A. Experimental and clinical study of phytopreparations from milk thistle. *Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2008; 4: 36 (in Russ.).
21. Anstee Q. M., Day C. P. S-adenosylmethionine (SAME) therapy in liver disease: a review of current evidence and clinical utility. *J. Hepatol.* 2012; 57(5): 1097–109.
22. Cederbaum A. I. Hepatoprotective effects of S-adenosyl-Lmethionine against alcohol- and cytochrome P450 2E1-induced liver injury. *World J. Gastroenterol.* 2010; 16(11): 1366–1376.
23. Loguercio C., Andreone P., Brisc C. Silybin combined with phosphatidylcholine and vitamin E in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012; 52: 1658–1665.
24. Kim E. J., Lee M. Y., Jeon Y. J. Silymarin inhibits morphological changes in LPS stimulated macrophages by blocking NF- κ B pathway. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*. 2015; 19: 211–8.
25. Testino G. Silimarin and S-adenosyl-L methionine (SAME): two promising pharmacological agents in case of cronic alcoholic hepatothopathy. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 2013; 59(4): 341–356.
26. Malyutina A. U., Pravlotskaya A. V., Novikov O. O., Pisarev D. I. Study of the component composition of polyphenols of the herb *Pentaphylloides fruticosa* L. *Pharmacy and pharmacology*. 2018; 6(2). DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2018-6-2-135-150> (in Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-113-118>
УДК 615.074; 543.545; 615.456.4; 535.361



Оригинальная статья/Research article

Оптимизация методов оценки степени включения доксорубина в наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA)

Т. С. Ковшова^{1,2*}, Н. С. Осипова², А. С. Фортунa³, Ю. В. Ермоленко²,
О. О. Максименко², В. Ю. Балабаньян¹, С. Э. Гельперина²

1 – Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова (МГУ имени М. В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, ГСП-1, Ленинские Горы, д. 1
2 – Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева (РХТУ им. Д. И. Менделеева), 125047, Россия, г. Москва, Миусская площадь, д. 9
3 – Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС» (НИТУ «МИСиС»), 119049, Россия, г. Москва, Ленинский проспект, д. 4

*Контактное лицо: Ковшова Татьяна Сергеевна. E-mail: kovshova.tatyana.nanofarm@gmail.com

Статья получена: 06.04.2020. Статья принята к печати: 25.05.2020

Резюме

Введение. Одним из важных физико-химических параметров лекарственных форм на основе наночастиц является степень включения лекарственного вещества (ЛВ) в наночастицы (НЧ). Выбор адекватного метода для оценки этого параметра, в том числе метода разделения свободной и связанной с носителем фракций ЛВ является важной задачей, при решении которой необходимо учитывать особенности конкретной наносомальной лекарственной формы (НЛФ).

Цель. Оптимизация методов оценки степени включения ЛВ в НЧ на примере НЛФ доксорубина на основе НЧ сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA-Dox НЧ).

Материалы и методы. PLGA-Dox НЧ были получены методом «двойных эмульсий» (вода/масло/вода) при различных значениях pH внешней водной фазы (7,4/6,4). Размер и распределение частиц по размерам (PDI) определяли методами фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Для оценки степени включения доксорубина НЧ отделяли методами центрифугирования, ультрафильтрации и гель-фильтрации. Эффективность отделения НЧ методом центрифугирования оценивали по содержанию PLGA в супернатанте методом капиллярного электрофореза (КЭФ).

Результаты и обсуждение. Средний гидродинамический диаметр НЧ PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 в воде (ФКС) составил 103 ± 10 нм и 141 ± 8 нм соответственно. По данным ПЭМ размер полученных НЧ составил в среднем 50 ± 16 нм. Степень включения доксорубина, определенная при отделении наночастиц центрифугированием при ускорении $48254 \times g$, составила $78,9 \pm 1,8$ % для PLGA-Dox/6,4 НЧ и $91,5 \pm 0,9$ % для PLGA-Dox/7,4 НЧ, при этом содержание PLGA в супернатанте не превышало 5 %. Меньшее ускорение обеспечивало неполное осаждение НЧ и занижение степени включения. Метод ультрафильтрации (NMWL 50 и 100 кДа) также позволил достоверно определить степень включения, при этом сорбция доксорубина не превышала 4 %. В то же время отделение НЧ методом гель-фильтрации привело к значительной десорбции доксорубина с поверхности НЧ за счет создания условий значительного разбавления.

Заключение. Для определения степени включения доксорубина в PLGA-Dox НЧ наилучшим образом подходит метод центрифугирования (оптимальным является ускорение $48254 \times g$) и метод ультрафильтрации при использовании мембранных фильтров с диаметром пор 50 и 100 кДа.

Ключевые слова: наночастицы, PLGA, доксорубин, степень включения, ультрафильтрация, центрифугирование, гель-фильтрация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Т. С. Ковшова и Н. С. Осипова осуществляли получение и физико-химический анализ наночастиц. А. С. Фортунa проводила анализ размеров НЧ методом ПЭМ. Ю. В. Ермоленко разработала методику определения PLGA в образцах PLGA-Dox НЧ (КЭФ). О. О. Максименко и С. Э. Гельперина разработали и оптимизировали метод получения наночастиц, нагруженных доксорубином. В. Ю. Балабаньян осуществлял общее руководство проектом. Все авторы принимали участие в анализе данных и обсуждении результатов.

Благодарность. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-015-00276. Авторы выражают благодарность компаниям Evonik Nutrition & Care GmbH и CPN Pharma b.v. за предоставленный образец полимера Resomer® 502H.

Для цитирования: Ковшова Т. С., Осипова Н. С., Фортунa А. С., Ермоленко Ю. В., Максименко О. О., Балабаньян В. Ю., Гельперина С. Э. Оптимизация методов оценки степени включения доксорубина в наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 113–118.

Optimization of Methods for Determination of the Encapsulation Efficiency of Doxorubicin in the Nanoparticles Based on Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)

Tatyana S. Kovshova^{1,2*}, Nadezhda S. Osipova², Anastasiya S. Fortuna³, Yulia V. Ermolenko²,
Olga O. Maksimenko², Vadim Yu. Balabanyan¹, Svetlana E. Gelperina²

1 – M. V. Lomonosov Moscow State University, GSP-1, 1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia
2 – D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 9, Miusskaya Sq., Moscow, 125047, Russia
3 – National University of Science and Technology «MIIS», 4, Leninskiy prospekt, Moscow, 119049, Russia

*Corresponding author: Tatyana S. Kovshova. E-mail: kovshova.tatyana.nanofarm@gmail.com

Received: 06.04.2020. Accepted: 25.05.2020

© Ковшова Т. С., Осипова Н. С., Фортунa А. С., Ермоленко Ю. В., Максименко О. О., Балабаньян В. Ю., Гельперина С. Э., 2020

© Kovshova T. S., Osipova N. S., Fortuna A. S., Ermolenko Yu. V., Maksimenko O. O., Balabanyan V. Yu., Gelperina S. E., 2020

Abstract

Introduction. Drug encapsulation efficiency (EE) is the important parameter of the nanoparticle-based drug formulations. Generally, the methods for evaluation of the EE are based on separation of the free and NP-bound fractions of the drug; however, applicability of these methods for a particulate formulation needs careful consideration.

Aim. The purpose of the study was to optimize the procedure for evaluation of the EE for a nanoparticle-based drug formulation taking doxorubicin loaded in the PLGA nanoparticles (PLGA-Dox NP) as a model formulation.

Materials and methods. The PLGA-Dox NP were prepared by a «double emulsion» method at pH of the external aqueous phase of 7.4 or 6.4. The NP size and size distribution (PDI) were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) and transmission electron microscopy (TEM). For the EE evaluation of doxorubicin, the NP were separated by centrifugation, ultrafiltration, or gel filtration. The efficiency of NP separation by the centrifugation method was evaluated by the PLGA content in the supernatant by capillary electrophoresis (CZE).

Results and discussion. The average hydrodynamic diameter of the PLGA-Dox/7.4 and PLGA-Dox/6.4 NP (FCS) was 103 ± 10 nm and 141 ± 8 nm, respectively. According to the TEM data, the main fraction of the NP averaged 50 ± 16 nm. The EE of doxorubicin, determined after the NP separation by centrifugation at $48254 \times g$, was 78.9 ± 1.8 % for the PLGA-Dox/6.4 and 91.5 ± 0.9 % for the PLGA-Dox/7.4 NP with the residual PLGA content in the supernatant of ~ 5 %. At lower acceleration the NP separation was incomplete leading to underestimation of the EE. Also, the ultrafiltration method using the filters with the NMWL of 50 and 100 kDa enabled the reliable NP separation with the minimal doxorubicin adsorption on the filter (<4 %). Separation of the NP by gel filtration led to the underestimation of the EE due to considerable desorption of doxorubicin from the NP surface.

Conclusion. The optimal analytical procedures for evaluation of the EE of doxorubicin in the PLGA NP are based on the NP separation by centrifugation at $48254 \times g$ and ultrafiltration using filters with NMWL of 50 and 100 kDa.

Keywords: nanoparticles, PLGA, doxorubicin, encapsulation efficiency, ultrafiltration, ultracentrifugation, gel filtration.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Tatyana S. Kovshova and Nadezhda S. Osipova carried out the preparation and physicochemical analysis of nanoparticles. Anastasiya S. Fortuna analyzed the size of the NP by TEM. Yulia V. Ermolenko developed a method for determining PLGA in PLGA-Dox NP (CZE). Olga O. Maksimenko and Svetlana E. Gelperina developed and optimized a method for preparation of doxorubicin-loaded NP. Vadim Yu. Balabanyan carried out general project management. All authors participated in data analysis and discussion of the results.

Acknowledgment. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research as part of research project No. 20-015-00276. The authors are grateful to Evonik Nutrition & Care GmbH and CPH Pharma b.v. for the provided polymer sample Resomer® 502H.

For citation: Kovshova T. S., Osipova N. S., Fortuna A. S., Ermolenko Yu. V., Maksimenko O. O., Balabanyan V. Yu., Gelperina S. E. Optimization of methods for determination of the encapsulation efficiency of doxorubicin in the nanoparticles based on poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA). *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 113–118.

ВВЕДЕНИЕ

Наночастицы (НЧ) – коллоидные полимерные частицы размером от 10 до 1000 нм, в которых активное вещество включено и/или адсорбировано на поверхности, на протяжении более 40 лет активно исследуются в качестве систем доставки лекарственных веществ (ЛВ). Физико-химические свойства НЧ, используемых в качестве носителей ЛВ, такие как размер и заряд поверхности, а также степень включения ЛВ и профиль его высвобождения из НЧ, оказывают влияние на эффективность и безопасность наноразмерной лекарственной формы (НЛФ). Изучение этих свойств требует применения особых методов анализа. В частности, для определения степени включения ЛВ в носитель (липосомы, полимерные НЧ) необходимо отделение носителя, содержащего включенное ЛВ, от свободного (не связанного с носителем) ЛВ с последующим анализом «свободной» фракции ЛВ и оценкой фракции (косвенной или прямой), связанной с носителем. Для отделения НЧ можно использовать методы центрифугирования, ультрафильтрации или гель-фильтрации, при этом выбор метода зависит от особенности конкретной НЛФ [1–4]. В частности, важным параметром, определяющим пригодность метода, является эффективность отделения НЧ от дисперсионной среды, поскольку неполное отделение НЧ может привести к неточным (заниженным) оценкам степени включения.

Цель настоящего исследования – оптимизация методов оценки степени включения ЛВ в НЧ на примере НЛФ доксорубина на основе НЧ сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA-Dox НЧ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение PLGA-Dox НЧ

Наночастицы PLGA, нагруженные доксорубином (PLGA-Dox НЧ), получали методом «двойных эмульсий» ($W_1/O/W_2$), как описано в опубликованных ранее работах авторов [5]. Первичную эмульсию (W_1/O) получали путем эмульгирования внутренней водной фазы (W_1), представляющей собой раствор доксорубина гидрохлорида (Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals, Hong Kong, China) в 0,001 н соляной кислоте, с раствором PLGA (Resomer® 502H, D,L-лактид/гликолид = 50:50 моль/моль; молекулярная масса 7–17 кДа, Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия) в дихлорметане (х.ч., Химмед, Россия) при помощи гомогенизатора (Ultra-Turrax T 18 Basic, IKA, Германия) в течение 1 минуты при 23600 об/мин. Соотношение доксорубин : PLGA составило 1:10 в/в, соотношение объемов водной (W_1) и органической фаз 2:3. Для получения двойной эмульсии ($W_1/O/W_2$) первичную эмульсию диспергировали в 5-кратном объеме 1 % водного раствора поливинилового спирта (ПВС, 9–10 кДа, Sigma-Aldrich, Германия) в фосфатно-солевом буфере (PBS,

ПанЭко, Россия) при pH 6,4 или 7,4 с помощью Ultra-Turrax T 18 (2 мин, 23600 об/мин), а затем подвергали гомогенизации под высоким давлением (15000 psi, 3 минуты; Microfluidizer M-110P, Microfluidics, США). Органический растворитель удаляли под вакуумом, полученную наносуспensionцию фильтровали через стеклянный фильтр, добавляли маннит (5 % м/о) в качестве криопротектора и разливали во флаконы по 1,5 мл. После лиофилизации (Alpha 2-4 LSCplus, Martin Christ GmbH, Германия) образцы хранили в холодильнике при температуре +4–5 °С.

Изучение физико-химических параметров PLGA-Dox НЧ

Средний гидродинамический диаметр частиц и распределение частиц по размерам (PDI) определяли методом фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС), дзета-потенциал поверхности НЧ – методом микроэлектрофореза (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Великобритания) при разведении суспензии НЧ в воде Milli-Q до концентрации 0,2 мг/мл по полимеру (угол 173°, +25 °С, n = 4). Размер и морфологию НЧ оценивали также при помощи просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ, микроскоп JEOL JEM-1400, Япония); контрастирующий агент – 1 % раствор уранила ацетата. Содержание полимера в PLGA-Dox определяли методом капиллярного электрофореза (КЭФ, Капель-105M, Lumex, Россия) с программным обеспечением Elforun® (Lumex, Россия), как описано в [6]. Для этого во флакон с лиофилизатом НЧ добавляли 2 мл 1,0 н раствора NaOH; смесь инкубировали 24 ч при +37 °С при перемешивании (200 об/мин). Гидролизат разбавляли в 1000 раз водой Milli-Q и определяли содержание полимера по количеству молочной кислоты, образующейся в результате гидролиза. Общее содержание доксорубина в PLGA-Dox НЧ определяли спектрофотометрически (Shimadzu UV-1800, Япония) при $\lambda_{\max} = 480$ нм после растворения лиофилизата НЧ в ДМСО (0,00–50 мкг/мл; r = 0,9995). Для определения каждого показателя проводили 3 параллельных измерения (n = 3).

Определение степени включения доксорубина в PLGA-Dox НЧ

Степень включения доксорубина в PLGA-Dox НЧ оценивали путем отделения фракции НЧ от свободного доксорубина методами центрифугирования, ультрафильтрации и гель-фильтрации.

Метод центрифугирования

Леофилизат НЧ ресуспендировали в 1,5 мл дистиллированной воды, НЧ отделяли центрифугированием с использованием различных режимов: 1) на центрифуге Eppendorf 5804R (Германия), ускорение 15000xg, 30 мин при +18 °С; 2) на ультрацентрифуге Avanti JXN-30 (Beckman Coulter, США), ускорение 20000xg/30000xg/48254xg/75000xg/100000xg, 30 мин при

+5 °С. Объем центрифугируемой суспензии и отбираемой аликвоты супернатанта для анализа составляли в первом случае 0,5 и 0,05 мл, во втором – 1 и 0,2 мл соответственно. Концентрацию свободного доксорубина в супернатанте определяли спектрофотометрически с использованием калибровочной кривой в воде (0,00–52,50 мкг/мл; r = 0,9979). Степень включения доксорубина рассчитывали как отношение (%) разницы содержания общего и свободного доксорубина к его общему содержанию в образце:

$$\text{Степень включения (\%)} = \frac{(C_{\text{общ.}} - C_{\text{свобод.}})}{C_{\text{общ.}}} \times 100 \%. \quad (1)$$

Для оценки эффективности осаждения НЧ содержание PLGA в супернатантах определяли методом КЭФ после щелочного гидролиза, как описано выше. Для этого к 100 мкл неразбавленного супернатанта прибавляли 10 мкл 1,0 н раствора NaOH, инкубировали 24 ч при +37 °С. Перед анализом смесь разбавляли в 100 раз водой Milli-Q. Остаточное содержание НЧ в супернатанте после центрифугирования рассчитывали, как отношение (%) содержания PLGA в супернатанте к его общему содержанию в образце. Все измерения выполняли параллельно с использованием 6 флаконов образца каждой серии PLGA-Dox НЧ.

Метод ультрафильтрации

Леофилизированные НЧ ресуспендировали в 1,5 мл дистиллированной воды, далее 500 мкл суспензии помещали в предварительно промытые водой фильтры Amicon® Ultra-0,5 (Millipore) из восстановленной целлюлозы с размером пор 10, 30, 50 и 100 кДа (NMWL) и центрифугировали (Eppendorf 5804R, 15000xg, 30 мин, +25 °С). Концентрацию доксорубина в фильтрате и степень включения доксорубина (%) в PLGA-Dox НЧ рассчитывали как описано выше (n = 6). Контрольный раствор доксорубина гидрохлорида с концентрацией 1,0 мг/мл подвергали ультрафильтрации в тех же условиях (n = 6) для оценки степени сорбции на фильтрах (%).

Метод гель-фильтрации

Для оценки степени включения свободный доксорубин отделяли методом гель-фильтрации (Sephadex® G25, GE Healthcare, Швеция; колонка 32 × 110 мм, объем геля ~70 мл). Для оценки влияния объема анализируемого образца на качество разделения на колонку наносили образцы сконцентрированной в 2 раза суспензии НЧ объемом 2–3 мл или 10–12 мл; фракцию «отмытых» от свободного доксорубина НЧ (10–15 мл) собирали и лиофильно высушивали. Степень включения (%) рассчитывали как отношение нагрузки доксорубина в НЧ после и до отделения фракции свободного доксорубина:

$$\text{Нагрузка} = \text{Доксорубин} [\text{мг}] / \text{PLGA} [\text{мг}] \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \text{Степень включения (\%)} = \\ = (\text{нагрузка}_{\text{отмытые}} / \text{нагрузка}_{\text{неотмытые}}) \times 100 \%. \quad (3) \end{aligned}$$

Отделение свободной фракции доксорубина от НЧ методом гель-фильтрации в обоих случаях проводили в двукратной повторности для оценки сходимости; содержание доксорубина и PLGA в «отмытых» НЧ определяли для трех параллельных образцов.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета анализа данных Statsoft Statistica 10. Для статистического анализа физико-химических данных использовали t-критерий Стьюдента; статистический уровень значимости $p < 0,05$. Полученные результаты представлены как средние значения \pm стандартное отклонение (sd), при этом указано число параллельных измерений (n).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекула доксорубина обладает амфифильными свойствами, поэтому его растворимость зависит от pH: при понижении pH фосфатно-солевого буфера до 6,4 происходит смещение ионного равновесия амфифильной молекулы доксорубина в сторону образования катионов с протонированной аминогруппой, обладающих большей растворимостью в воде и меньшим сродством к гидрофобной матрице PLGA [7]. Соответственно, мы предположили, что путем варьирования pH внешней водной фазы двойной эмульсии (1 % раствор ПБС в PBS; pH 6,4 или 7,4) можно получить НЧ с разной степенью включения. В таблице 1 приведены усредненные значения параметров PLGA-Dox/6,4 и PLGA-Dox/7,4 НЧ (3 серии каждого типа). До лиофилизации гидродинамический диаметр обоих типов НЧ составлял 90–100 нм, однако после лиофилизации в суспензии PLGA-Dox/6,4 НЧ появлялись микроагрегаты (3–5 мкм), фракция которых составила от 3 до 6 %; с учетом микронной фракции средний гидродинамический диаметр PLGA-Dox/6,4 НЧ составил 141 ± 8 нм. Размеры НЧ, определенные с помощью ПЭМ, были значительно меньше и составляли в среднем 50 ± 16 нм (рисунок 1). Средний размер НЧ, измеренный методом ФКС, представляет собой гидродинамический диаметр наночастицы, при этом он теоретически должен превышать размер, определенный методом ПЭМ, так как в первом случае учитывается размер гидратной оболочки вокруг НЧ [8]. Поскольку полученные наночастицы PLGA-Dox/6,4 и PLGA-Dox/6,4 имеют отрицательный дзета-потенциал поверхности, величина гидратной оболочки вносит существенный вклад в величину среднего размера, определенного методом ФКС.

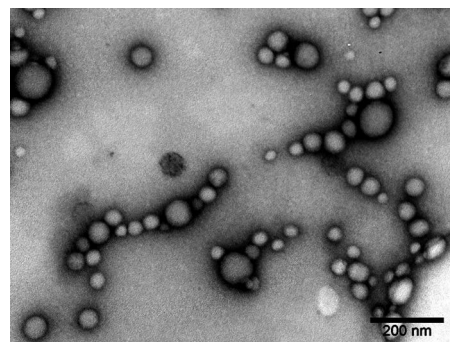


Рисунок 1. Электронная микрофотография PLGA-Dox/7,4 наночастиц (просвечивающий электронный микроскоп JEOL JEM-1400, Япония); контрастирующий агент 1 % раствор уранила ацетата

Figure 1. Electron micrograph of PLGA-Dox/7,4 nanoparticles (transmission electron microscope JEOL JEM-1400, Japan); contrasting agent 1 % uranyl acetate solution

Как было отмечено выше, для определения включения ЛВ в НЧ необходимо отделение его несвязанной (свободной) фракции. Для выявления оптимального метода отделения НЧ в данном исследовании сравнивали методы центрифугирования, ультрафильтрации и гель-фильтрации. В опыте использовали репрезентативные серии НЛФ: PLGA-Dox/7,4* и PLGA-Dox/6,4*, имеющие средний гидродинамический диаметр 98 ± 3 нм (дзета-потенциал $-10,90 \pm 0,27$ мВ) и 142 ± 2 нм (дзета-потенциал $-4,79 \pm 0,33$ мВ) соответственно.

Как и предполагалось, PLGA-Dox/7,4* НЧ характеризуются более высокой степенью включения доксорубина по сравнению с PLGA-Dox/6,4*. При отделении НЧ методом центрифугирования основным фактором, оказывающим влияние на результат анализа, является ускорение. Как видно из рисунка 2, степень включения возрастает с увеличением ускорения, что связано с неполным осаждением НЧ при низком ускорении и, как следствие, завышенным содержанием доксорубина, определяемым в супернатанте.

В среднем содержание PLGA в супернатанте при низком ускорении ($15000 \times g$, $+18$ °C) составляет более 20 % от исходного ($27,2 \pm 0,9$ % для PLGA-Dox/7,4* и $21,2 \pm 1,6$ % для PLGA-Dox/6,4* соответственно), а при увеличении ускорения до $48254 \times g$ снижается до значений менее 5 % ($5,0 \pm 0,3$ % для PLGA-Dox/7,4* и $4,0 \pm 0,1$ % для PLGA-Dox/6,4* соответственно). При этом в первом случае наблюдается занижение степени включения доксорубина по сравнению со значениями, полученными при ускорении $48254 \times g$: $79,9 \pm 1,1$ % vs $92,6 \pm 0,6$ % ($p < 0,05$) для PLGA-Dox/7,4* и $63,7 \pm 2,5$ %

Таблица 1. Физико-химические параметры наночастиц, нагруженных доксорубином (PLGA-Dox, n = 3, среднее \pm sd)

Table 1. Physicochemical parameters of the nanoparticles loaded with doxorubicin (PLGA-Dox, n = 3, average \pm sd)

Тип НЧ	Содержание доксорубина, мг/флакон	Содержание PLGA, мг/флакон	Размер, нм	PDI	Дзета-потенциал, мВ
PLGA-Dox/7,4	$1,67 \pm 0,06$	$15,55 \pm 2,16$	103 ± 10	$0,149 \pm 0,007$	$-10,61 \pm 0,80$
PLGA-Dox/6,4	$1,67 \pm 0,02$	$16,68 \pm 0,08$	141 ± 8	$0,272 \pm 0,071$	$-7,03 \pm 1,95$

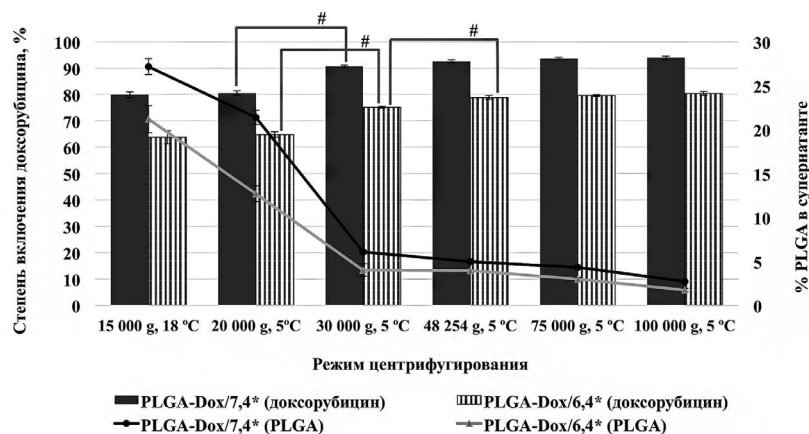


Рисунок 2. Влияние режима центрифугирования на степень включения доксорубина (%) в PLGA-Dox/7.4* и PLGA-Dox/6.4* наночастицы и эффективность осаждения наночастиц по содержанию PLGA (%) в супернатанте (n = 6, среднее \pm sd); # – p < 0,05

Figure 2. Influence of centrifugation parameters on encapsulation efficiency of doxorubicin (%) in PLGA-Dox/7.4* and PLGA-Dox/6.4* nanoparticles and the efficiency of nanoparticles separation by PLGA content (%) in the supernatant (n = 6, average \pm sd); # – p < 0,05

vs $78,9 \pm 0,7$ % (p < 0,05) для PLGA-Dox/6,4* соответственно. Отметим, что осаждение PLGA-Dox/6,4* происходит эффективнее, чем PLGA-Dox/7,4* при любом режиме центрифугирования (p < 0,05); возможно, это происходит из-за склонности этих НЧ к агрегации. Статистически значимые различия (p < 0,05) между значениями степени включения и содержания PLGA в супернатантах наблюдаются при центрифугировании с ускорением 30000xg и менее (15000xg и 20000xg) для обоих типов НЧ. Помимо этого, для PLGA-Dox/6,4* НЧ также отмечены статистически значимые различия между значениями степени включения при центрифугировании с ускорением 30000xg и 48254xg (p < 0,05). Таким образом, необходимым и достаточным для эффективного осаждения НЧ обоих типов является ускорение 48254xg: в этом случае остаточное содержание PLGA в супернатанте не превышает 5 % от исходного. В то же время для осаждения основной массы НЧ (более 90 %) приемлемым является ускорение более 30000xg. В отличие от липосом аналогичного размера (около 100 нм), для осаждения которых методом центрифугирования требуется длительное время (10–20 часов) и ускорение более 200000xg ввиду близкой плотности частиц и окружающей среды [2], твердые коллоидные частицы PLGA-Dox могут быть эффективно отделены от свободной фракции доксорубина за короткое время.

При использовании метода ультрафильтрации для отделения НЧ от свободной фракции ЛВ важным фактором, влияющим на результат анализа, является сорбция свободного ЛВ на мембране. В таблице 2 приведены значения степени включения доксорубина в НЧ PLGA-Dox/7,4* и PLGA-Dox/6,4* при отделении НЧ методом ультрафильтрации на фильтрах с разным диаметром пор. При использовании фильтров Amicon® Ultra-0,5 (Millipore) с диаметром пор 50 и 100 кДа сорбция доксорубина на фильтрах составила $3,5 \pm 0,5$ % и $1,9 \pm 0,5$ % соответственно (p < 0,05). При использовании фильтров с диаметром пор 10 и 30 кДа заметно

занижение содержания свободного доксорубина в супернатанте, и, следовательно, некоторое завышение степени включения доксорубина в НЧ в связи с более значительной сорбцией на фильтрах ($17,6 \pm 0,8$ % и $7,7 \pm 0,7$ % соответственно). При этом полимер в фильтрах даже в случае фильтров с NMWL 100 кДа (КЭФ) содержался в следовых количествах (менее 1 %), соответствующих содержанию водорастворимой фракции PLGA в НЧ. Таким образом, PLGA-Dox НЧ эффективно отделяются при ультрафильтрации, в отличие от липосом размером 100 нм, для которых отмечено прохождение через фильтры с аналогичным NMWL ввиду большей пластичности [2]. По-видимому, в отличие от центрифугирования при низких значениях ускорения, метод ультрафильтрации позволяет отделить наиболее мелкие НЧ, которые остаются в супернатанте. Таким образом, в данном случае метод ультрафильтрации при использовании фильтров с минимальной сорбцией (NMWL 50 или 100 кДа) может заменить метод центрифугирования при отсутствии в аналитической лаборатории высокоскоростной центрифуги (с ускорением более 30000xg).

Таблица 2. Степень включения доксорубина (%) в PLGA-Dox при отделении НЧ методом ультрафильтрации (n = 6)

Table 2. Encapsulation efficiency of doxorubicin (%) in the separation of nanoparticles by ultrafiltration (n = 6)

Тип НЧ	Amicon® Ultra-0,5 (Millipore), NMWL			
	10 кДа	30 кДа	50 кДа	100 кДа
PLGA-Dox/7,4*	93,7 \pm 0,6	93,2 \pm 0,6	92,0 \pm 0,4	91,8 \pm 0,2
PLGA-Dox/6,4*	83,2 \pm 0,2	77,5 \pm 0,3	76,7 \pm 0,4	76,4 \pm 0,1

Помимо центрифугирования и ультрафильтрации, гель-фильтрация также широко используется для разделения свободного ЛВ и НЧ: НЧ быстро проходят сквозь гель, а свободное ЛВ удерживается в порах геля. Однако в отличие от первых двух методов, для которых степень включения оценивали косвенно

но по уравнению (1), используя значения содержания свободного доксорубина в супернатанте или фильтрате после отделения НЧ, в случае гель-фильтрации степень включения рассчитывали напрямую как отношение между нагрузкой доксорубина в НЧ после отделения свободной фракции на колонке и в исходных НЧ. Для оценки влияния отношения объема образца к объему геля на эффективность разделения свободного доксорубина и НЧ на колонку, заполненную гелем Sephadex® G25, наносили образцы с различным соотношением объемов суспензии НЧ и геля: при соотношении 1:23–35 о/о были получены «отмытые» НЧ PLGA-Dox/7,4*G25(1) и PLGA-Dox/6,4*G25(1), при соотношении 1:5,8–7 о/о – «отмытые» НЧ PLGA-Dox/7,4*G25(2) и PLGA-Dox/6,4*G25(2). При этом рассчитывали отношение массы доксорубина к массе PLGA в образце (нагрузка) в «отмытых» и исходных НЧ (2). Степень включения, определенная как отношение нагрузки доксорубина в «отмытых» НЧ к аналогичному показателю в исходных НЧ, рассчитанная по уравнению (3), была значительно ниже, чем рассчитанная косвенным методом по уравнению (1) при отделении НЧ методами центрифугирования и ультрафильтрации (таблица 3). По всей видимости, при таком способе отделения НЧ при взаимодействии пробы с сорбентом создаются условия значительного разбавления, что приводит к существенному вымыванию доксорубина с поверхности PLGA НЧ. При этом 5-кратное увеличение отношения объема наносимой пробы к объему колонки существенно сказалось на значении степени включения для НЧ, полученных при pH 6,4.

Таблица 3. Степень включения доксорубина (%) в PLGA-Dox при отделении НЧ методом гель-фильтрации, (n = 6)

Table 3. Encapsulation efficiency of doxorubicin (%) in the separation of nanoparticles by gel filtration (n = 6)

Образец	Содержание доксорубина (мг/флакон)	Содержание PLGA (мг/флакон)	Степень включения доксорубина, %
PLGA-Dox/7,4*	1,71 ± 0,05	17,02 ± 0,96	–
PLGA-Dox/7,4*G25(1)	0,333 ± 0,010	4,50 ± 0,02	73,8 ± 2,0
PLGA-Dox/7,4*G25(2)	0,73 ± 0,01	9,82 ± 0,04	74,3 ± 2,0
PLGA-Dox/6,4*	1,67 ± 0,03	17,00 ± 0,57	–
PLGA-Dox/6,4*G25(1)	0,045 ± 0,002	2,12 ± 0,01	21,6 ± 0,4
PLGA-Dox/6,4*G25(2)	0,16 ± 0,01	5,90 ± 0,07	27,6 ± 0,5

Как отмечено выше, в случае НЧ, полученных при pH 6,4, доксорубин обладает большей растворимостью в воде и меньшим сродством к гидрофобной матрице PLGA. Вероятно, в этих НЧ доксорубин находится в основном на поверхности и в приповерхностном слое; в условиях значительного разбавления (гель-фильтрация) ~80 % доксорубина десорбируется с поверхности PLGA-Dox/6,4 НЧ и только 20 % остается связанным с НЧ и будет высвобождаться только в процессе их деградации. В отличие от липосом, пред-

ставляющих собой замкнутый наноконтейнер с липидной оболочкой, для которых гель-фильтрация является обычным методом разделения свободного и инкапсулированного ЛВ [9], степень включения ЛВ в PLGA НЧ в большей степени зависит от градиента концентраций ЛВ в среде, поскольку в такой системе существует равновесие между адсорбцией и десорбцией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для определения степени включения доксорубина в PLGA НЧ наилучшим образом подходит метод центрифугирования при ускорении > 30000xg. Оптимальным является ускорение 48254xg: степень включения доксорубина составила 78,9 ± 1,8 % для PLGA-Dox/6,4 НЧ и 91,5 ± 0,9 % для PLGA-Dox/7,4 НЧ (усредненные значения степени включения доксорубина в НЧ для трех серий каждого типа). Меньшее ускорение приводит к неполному осаждению НЧ и занижению степени включения. Достоверно определять степень включения доксорубина в НЧ можно также методом ультрафильтрации при использовании фильтров с NMWL 50 и 100 кДа. При использовании метода гель-фильтрации происходит значительная десорбция доксорубина с поверхности и приповерхностного слоя НЧ, что приводит к занижению степени включения. Тем не менее, метод гель-фильтрации в данном случае позволяет оценить сколько доксорубина находится внутри матрицы или прочно с ней связано.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Liu Z., Zhu Y. Y., Li Z. Y., Ning S. Q. Evaluation of the efficacy of paclitaxel with curcumin combination in ovarian cancer cells. *Oncol Lett.* 2016; 12(5): 3944–3948. DOI: 10.3892/ol.2016.5192.
- Wallace S. J., Li J., Nation R. L., Boyd B. J. Drug release from nanomedicines: selection of appropriate encapsulation and release methodology. *Drug Deliv Transl Res.* 2012; 2 (4): 284–292. DOI: 10.1007/s13346-012-0064-4.
- Beck P., Scherer D., Kreuter J. Separation of drug-loaded nanoparticles from free drug by gel filtration. *J Microencapsul.* 1990; 7(4): 491–496. DOI: 10.3109/02652049009040471.
- Zheng Y., Wu Y., Yang W., Wang C., Fu S., Shen X. Preparation, characterization, and drug release in vitro of chitosan-glycyrrhetic acid nanoparticles. *J Pharm Sci.* 2006; 95 (1): 181–191. DOI: 10.1002/jps.20399.
- Maksimenko O., Malinovskaya J., Shipulo E., Osipova N., Razzhivina V., Arantseva D., Yarovaya O., Mostovaya U., Khalansky A., Fedoseeva V., Alekseeva A., Vanchugova L., Gorshkova M., Kovalenko E., Balabanyan V., Melnikov P., Baklaushv V., Chekhonin V., Kreuter J., Gelperina S. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. *Int J Pharm.* 2019; 572: 118733. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118733.
- Kumskova N., Ermolenko Y., Osipova N., Semyonkin A., Kildeeva N., Gorshkova M., Kovalskii A., Kovshova T., Tarasov V., Kreuter J., Maksimenko O., Gelperina S. How subtle differences in polymer molecular weight affect doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles degradation and drug release. *J Microencapsul.* 2020; 3(37): 283–295. DOI: 10.1080/02652048.2020.1729885.
- Fölöp Z., Gref R., Löftsson T. A permeation method for detection of self-aggregation of doxorubicin in aqueous environment. *Int J Pharm.* 2013; 454(1): 559–561. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.06.058.
- Booth A., Vogel V., Schubert D., Kreuter J. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004; 57(2): 369–375. DOI: 10.1016/S0939-6411(03)00193-0.
- Ruysschaert T., Marque A., Duteyrat J. L., Lesieur S., Winterhalter M., Fournier D. Liposome retention in size exclusion chromatography. *BMC biotechnol.* 2005; 5(1): 11. DOI: 10.1186/1472-6750-5-11.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-119-123>
УДК 616-006-009.7-036.12-085.212.015.154:615.03



Оригинальная статья/Research article

Изучение параметров фармакокинетики препарата морфин гидрохлорид, таблетки пролонгированного действия у онкологических пациентов с хроническим болевым синдромом сильной интенсивности

Е. А. Ежова¹, И. Г. Котельникова¹, А. В. Тетенева^{2,4*}, Д. В. Бутузова³, К. Ф. Тетенев²

1 – ФГУП «Московский эндокринный завод», 109052, Россия, г. Москва, ул. Новохохловская, д. 25

2 – ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России), 63400, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

3 – ООО «Медикал Девелопмент Эдженси», 121096, Россия, г. Москва, ул. Васильевы Кожини, д. 1, офис 803.6

4 – ОГБУЗ «Медико-санитарная часть № 2», 634063, Россия, г. Томск, ул. Бела Куна, д. 3

*Контактное лицо: Тетенева Анна Валентиновна. E-mail: anna.dubodelova@mail.ru

Статья получена: 23.12.2019. Статья принята к печати: 20.03.2020

Резюме

Введение. Эффективная лекарственная терапия онкологическим пациентам хронического болевого синдрома (ХБС) сильной интенсивности является одной из приоритетных задач современного здравоохранения. В настоящее время для купирования боли используют ненаркотические и наркотические анальгетики по трехступенчатой схеме. При отсутствии противопоказаний предпочтительным является назначение препаратов внутрь и пролонгированных форм, что позволит пациенту сохранить самостоятельность и психологический комфорт. **Цель.** Изучение фармакокинетических свойств лекарственного препарата с пролонгированным механизмом действия «Морфина гидрохлорид» (форма выпуска таблетки в дозировке 30 мг, покрытые пленочной оболочкой) у онкологических пациентов с ХБС сильной интенсивности.

Материалы и методы. Для анализа фармакокинетики исследуемого препарата после однократного и многократного приема 20 пациентов, которые получали 10-дневную анальгетическую терапию исследуемым препаратом «Морфина гидрохлорид» (таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 30 мг). Производитель ФГУП «Московский эндокринный завод» (Россия). Путь введения: внутрь. Продолжительность исследования составила 17 дней из них: продолжительность скрининга до 7 дней; длительность терапии до 10 дней.

Результаты и обсуждение. Проведено определение концентрации морфина в плазме крови методом ВЭЖХ-тандемной-масс-спектрометрии в течение 12 часов после приема исследуемого препарата (1 таблетка пролонгированного действия, покрытая пленочной оболочкой, 30 мг). После многократного применения препарата были получены следующие значения фармакокинетических параметров в день 5 соответственно: $T_{1/2} - 6,08 \pm 4,37$ ч и $14,46 \pm 30,86$ ч, $T_{max} - 2,5 \pm 1,86$ ч, $C_{max} - 43,91 \pm 27,24$ нг/мл. Представлены усредненные за все дни значения фармакокинетических параметров. Установлено, что $T_{1/2}$ для исследуемого препарата $T_{1/2}$ составляет $9,21 \pm 14,94$ ч; $T_{max} - 2,87 \pm 2,36$ ч. Среднее значение максимальной концентрации (C_{max}) на день применения исследуемого препарата составило 36,52 нг/мл.

Заключение. В результате изучения фармакокинетики установлено, что препарат «Морфина гидрохлорид» (таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 30 мг) обнаружен в сыворотке крови после приема внутрь через 15 минут и достигает максимальной концентрации в крови через 3 часа, период полувыведения составляет в среднем 9 часов, максимальная концентрация составляет 36,52 нг/мл.

Ключевые слова: наркотические лекарственные препараты, клинические исследования, фармакокинетика, морфина гидрохлорид, таблетки пролонгированного действия.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Е. А. Ежова, И. Г. Котельникова, Д. В. Бутузова разработали и внедрили методику изучения фармакокинетики морфина гидрохлорид, таблетки пролонгированного действия, у онкологических пациентов с хроническим болевым синдромом сильной интенсивности в клиническое исследование. А. В. Тетенева и К. Ф. Тетенев участвовали в проведении клинического исследования. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Ежова Е. А., Котельникова И. Г., Тетенева А. В., Бутузова Д. В., Тетенев К. Ф. Изучение параметров фармакокинетики препарата морфин гидрохлорид, таблетки пролонгированного действия у онкологических пациентов с хроническим болевым синдромом сильной интенсивности. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 119–123.

The Study of Pharmacokinetics Parameters of Morphine Hydrochloride, Long-acting Tablets in Cancer Patients with Severe Chronic Pain Syndrome

Ekaterina A. Ezhova¹, Inna G. Kotelnikova¹, Anna V. Teteneva^{2,4*}, Daria V. Butuzova³, Konstantin F. Tetenev²

1 – Moscow Endocrine Factory, 25, Novokhokhlovskaya str., Moscow, 109052, Russia

2 – Siberian State Medical University, 2, Moscow tract, Tomsk, 63400, Russia

3 – LLC Medical Development Agency, office 803.6, 1, Vasilisy Kozhinoi str., Moscow, 121096, Russia

4 – Medical and Sanitary Unit No. 2, 3, Bela Kuna str., Tomsk, 634063, Russia

*Corresponding author: Anna V. Teteneva. E-mail: anna.dubodelova@mail.ru

Received: 23.12.2019. Accepted: 20.03.2020

Abstract

Introduction. Effective drug therapy for cancer patients with chronic pain syndrome (CPS) of high intensity is one of the priorities of modern healthcare. Currently, non-narcotic and narcotic analgesics are used for pain relief according to a three-steps scheme. In the absence of contraindications, it is preferable to prescribe medications per os and prolonged forms, which will allow the patient to maintain selfcare and comfort.

© Ежова Е. А., Котельникова И. Г., Тетенева А. В., Бутузова Д. В., Тетенев К. Ф., 2020

© Ezhova E. A., Kotelnikova I. G., Butuzova D. V., Teteneva A. V., Tetenev K. F., 2020

Aim. To study the pharmacokinetic properties of a drug with a prolonged mechanism of action «Morphine hydrochloride», in a film-coated tablet form of a dosage 30 mg, in cancer patients with severe CPS.

Materials and methods. For the analysis of the pharmacokinetics of the studied drug after single and multiple doses of 20 patients who received 10-day analgesic therapy with the studied drug «Morphine hydrochloride», long-acting film-coated 30 mg tablets, manufacturer FSUE Moscow Endocrine Plant, Russia. Route of administration: per os. The study duration was 17 days: screening duration up to 7 days; duration of therapy up to 10 days.

Results and discussion. The concentration of morphine in plasma was determined by HPLC-tandem mass spectrometry, within 12 hours after taking the study drug (1 of long-acting, film-coated tablet 30 mg). The following pharmacokinetic parameters were obtained on Day 5: $T_{1/2}$ – 6.08 ± 4.37 hours and 14.46 ± 30.86 hours, T_{max} – 2.5 ± 1.86 hours, C_{max} – 43.91 ± 27.24 ng/ml. Values of pharmacokinetic parameters averaged over all days are presented. It was found that $T_{1/2}$ for the studied drug $T_{1/2}$ is 9.21 ± 14.94 hours, T_{max} 2.87 ± 2.36 hours. The average maximum concentration (C_{max}) on the day of the study drug was 36.52 ng/ml.

Conclusion. As a result of the study of pharmacokinetics, it was found that the drug «Morphine hydrochloride», long-acting tablets film-coated with a of 30 mg was found in serum after oral administration after 15 minutes and reaches a maximum concentration in the blood in 3 hours, the half-life is on average 9 hours, the maximum concentration is 36.52 ng/ml.

Keywords: narcotic drugs, clinical trials, pharmacokinetics, morphine hydrochloride, long-acting tablets.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Ekaterina A. Ezhova, Inna G. Kotelnikova, Daria V. Butuzova developed and implemented a method for studying the pharmacokinetics of morphine hydrochloride, long-acting tablets in cancer patients with severe pain syndrome. Anna V. Teteneva and Konstantin F. Tetenev conducted a clinical study. All authors participated in the discussion of the results and the writing of the text of the art.

For citation: Ezhova E. A., Kotelnikova I. G., Butuzova D. V., Teteneva A. V., Tetenev K. F. The study of pharmacokinetics parameters of morphine hydrochloride, long-acting tablets in cancer patients with severe chronic pain syndrome. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 119–123.

ВВЕДЕНИЕ

Эффективная лекарственная терапия онкологическим пациентам с ХБС сильной интенсивности является одной из приоритетных задач современного здравоохранения. Одним из механизмов решения данной проблемы является внедрение программы импортозамещения в России. Данная программа направлена на разработку с целью дальнейшей регистрации новых лекарственных форм отечественных наркотических препаратов в сфере производства обезболивающих фармацевтических субстанций, что позволит обеспечить высокоэффективное и доступное обезболивание онкологических пациентов [1, 2].

Для реализации программы необходимо проведение клинических и доклинических исследований с целым рядом особенностей, учитывающих специфический химический состав готовых лекарственных форм. Исследование фармакокинетики лекарственного препарата является обязательным при выполнении клинического исследования [3].

Болевой синдром является одним из тяжелых последствий и спутников онкологических заболеваний, в решении данной проблемы, важное значение имеет определение характера, интенсивности, лечения и предупреждения боли [4, 5]. В настоящее время для купирования боли используют ненаркотические и наркотические анальгетики по трехступенчатой схеме [6–8]. При отсутствии противопоказаний предпочтительным является назначение препаратов внутрь и пролонгированных лекарственных форм обезболивающих препаратов, которые позволяют пациенту сохранить самостоятельность и психологический комфорт [9, 10]. ФГУП «Московский эндокринный завод» разработал наркотический препарат «Морфина гидрохлорид» (таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 30 мг) для онкологических пациентов с хроническим болевым синдромом

(ХБС) сильной интенсивности. В рамках клинического исследования эффективности и безопасности было выполнено исследование фармакокинетических свойств лекарственного препарата «Морфина гидрохлорид» (таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 30 мг) для онкологических пациентов с ХБС сильной интенсивности.

Цель: изучение фармакокинетических свойств лекарственного препарата с пролонгированным механизмом действия «Морфина гидрохлорид» (форма выпуска таблетки в дозировке 30 мг, покрытые пленочной оболочкой) у онкологических пациентов с ХБС сильной интенсивности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Изучение фармакокинетики выполнено в рамках клинического исследования по протоколу № MRPН-04-17 «Многоцентровое, открытое, рандомизированное исследование в параллельных группах по изучению эффективности, безопасности и фармакокинетики препарата «Морфина гидрохлорид» [таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 30 мг] (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия) в сравнении с препаратом МСТ континус [таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 30 мг («Бард Фармасьютикалс Лтд», Великобритания)] у онкологических пациентов с хроническим болевым синдромом сильной интенсивности». В группу оценки фармакокинетики были включены 20 пациентов, у которых в ходе проведения прошедших 10-дневной анальгетической терапии лекарственным препаратом «Морфина гидрохлорид» (форма выпуска таблетки в дозировке 30 мг, покрытые пленочной оболочкой; производитель ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия) проводили отбор биобразцов

для фармакокинетического исследования после однократного и многократного (через 5 и 10 дней от начала терапии) приема препарата. Препарат назначался перорально.

Пациенты в группу оценки фармакокинетики были скринингованы и рандомизированы в двух в исследовательских центрах № 06* и № 08**.

Максимальная продолжительность участия в исследовании для каждого пациента составила 17 дней и определялась максимальной продолжительностью каждого из периодов исследования: период скрининга – до 7 дней; период терапии – 10 дней.

В группу оценки фармакокинетики были включены: пациенты в возрасте от 18 до 65 лет, соответствующие критериям включения/невключения в исследование. В группе оценки фармакокинетики два пациента досрочно завершили исследование. Причина досрочного выбывания – развитие серьезных нежелательных явлений (СНЯ), не связанных с приемом исследуемого препарата. Клиническое исследование было проведено на основании разрешения Министерства здравоохранения Российской Федерации № 4045597-20-1/3 от 19.06.2017 г. и одобрение центрального этического комитета (выписка из протокола № 149 от 01.06.2017 г.). До начала каких-либо процедур каждый пациент подписал форму информированного согласия на участие в исследовании, ранее одобренную регуляторными органами и локальными этическими комитетами клинических центров.

Описание метода

В биоаналитической лаборатории был разработан и валидирован биоаналитический метод определения морфина в плазме крови человека на K_2 ЭДТА с применением ВЭЖХ-МС системы, удовлетворяющий требованиям протокола исследования и валидированный в соответствии с руководством FDA для предприятий «Bioanalytical Method Validation» (май 2001 г.) и руководством EMA «Guideline on bioanalytical method validation» (июль 2011 г.). Анализ морфина в плазме крови осуществлялся методом ВЭЖХ-тандемной-масс-спектрометрии, который позволяет с высокой селективностью и точностью количественно определять содержание исследуемого вещества в биологических матрицах. Согласно литературным данным подобный анализ проводится на обращённо-фазовых хроматографических колонках с использованием водно-органической подвижной фазой или буферных растворов. В качестве проб подготовки, как правило, используют жидкость-жидкостную экстракцию органическими растворителями [11] или твердофазную экстракцию [12]. Воспроизводимость, прецизионность и правильность в процессе разработки методики была достигнута в интервале концентраций 0,1–100 нг/мл, таким образом разработанный метод пригоден для количественного определения морфина в плазме крови человека (K_2 ЭДТА в качестве антикоагулянта) в диапазоне от 0,1 нг/мл (LLOQ) до 100 нг/мл (ULOQ). Минимальный объём биоматериала для про-

ведения анализа составляет 180 мкл. Для количественного определения использовался метод градуировочного графика. В качестве параметра использовалось соотношение площадей пика аналита и внутреннего стандарта.

Тип калибровочной зависимости: линейная. Идентификация пика морфина происходила по его характеристичным ионам, родительскому и дочернему (режим MRM, m/z 285,90 > 152,20). Использовалось автоматическое интегрирование хроматограмм с помощью программного обеспечения LabSolution, версия 5.96.

Статистический анализ данных

Статистический анализ проводился с использованием программного комплекса NCSS 11.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования у пациентов методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) с высокой эффективностью была определена концентрация морфина после однократного и многократного (5 и 10 дней) приема исследуемого препарата (1 таблетка пролонгированного действия, покрытая пленочной оболочкой, 30 мг). Продолжительность наблюдения за концентрацией в каждый из дней составляла 12 часов. График отбора образцов крови: 0 ч (за 10–15 мин до первого приема исследуемого препарата в день 1 и за 10–15 мин до первого за день приема исследуемого препарата в дни 1 и 5 или последнего приема исследуемого препарата в день 10), далее через 15, 30 минут и далее через 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0 и 12,0 ч после приема препарата. Представлены индивидуальные значения по концентрациям препарата морфин у пациентов. Расчетные значения фармакокинетических параметров для каждого дня исследования представлены в рисунках 1 и 2. После однократного введения препарата «Морфина гидрохлорид» (таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 30 мг) $T_{1/2}$ составила $4,28 \pm 1,77$ ч; T_{max} $2,58 \pm 2,43$ ч; C_{max} составляет $30,67 \pm 14,43$ нг/мл. После многократного приема препарата «Морфина гидрохлорид» (таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 30 мг) были получены следующие значения фармакокинетических параметров – в день 5 и день 10 соответственно: $T_{1/2}$ – $6,08 \pm 4,37$ ч и $14,46 \pm 30,86$ ч; T_{max} – $2,5 \pm 1,86$ ч и $2,63 \pm 1,43$ ч; C_{max} – $43,91 \pm 27,24$ нг/мл и $39,21 \pm 27,1$ нг/мл. Произведен расчет усредненных за все дни значений фармакокинетических параметров, при этом $T_{1/2}$ составляет $9,21 \pm 14,94$ ч; T_{max} $2,87 \pm 2,36$ ч; C_{max} составляет $36,52 \pm 20,26$ нг/мл.

После многократного применения препарата были получены следующие значения фармакокинетических параметров – в день 5 соответственно: $T_{1/2}$ – $6,08 \pm 4,37$ ч и $14,46 \pm 30,86$ ч; T_{max} – $2,5 \pm 1,86$ ч; C_{max} – $43,91 \pm 27,24$ нг/мл. Представлены усредненные за все дни значения фармакокинетических параметров. Установлено, что $T_{1/2}$ для исследуемого препара-

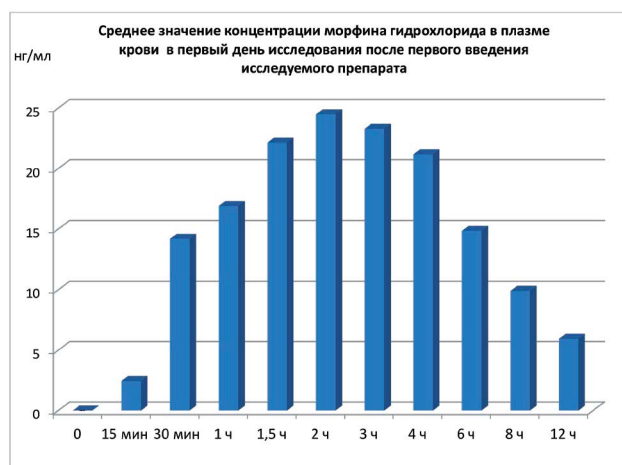


Рисунок 1. Результаты исследования концентрации морфина в крови пациентов после однократного приема «Морфина гидрохлорид», таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой в День исследования 1

Figure 1. Results of the study of the concentration of morphine in the blood of patients after a single dose of «Morphine hydrochloride», long-acting tablets, coated with a film on the day of the study 1



Рисунок 2. Результаты исследования концентрации морфина в крови пациентов после многократного приема препарата «Морфина гидрохлорид», таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 30 мг в день исследования 5

Figure 2. Results of the study of the concentration of morphine in the blood of patients after repeated administration of the drug «Morphine hydrochloride», long-acting tablets, coated with a film 30 mg per day of the study 5

та $T_{1/2}$ составляет $9,21 \pm 14,94$ ч; T_{max} $2,87 \pm 2,36$ ч. Среднее значение максимальная концентрация (C_{max}) на день применения исследуемого препарата составило 36,52 нг/мл.

Сравнительный анализ выполненных ранее исследований фармакокинетики с настоящим исследованием показал следующее: остаточная концентрация препарата через 12 часов у пациентов обеих групп не превышает 2,4 нг/мл после приема 10 мг препарата «Морфина сульфат» с замедленным высвобождением. По результатам собственных исследований после приема 30 мг препарата «Морфина гидрохлорид» (таблетки пролонгированного действия, 30 мг) данная концентрация составила примерно 5,95 нг/мл, что превышает остаточную концентрацию после при-

ема препарата с дозой 10 мг примерно в 2,5 раза. При этом значение показателя AUC_{0-t} после однократного приема препарата «Морфина гидрохлорид» (таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 30 мг) составило $170,27 \pm 88,49$ нг · ч/мл за 12 часов, для таблеток «Морфина сульфат», 10 мг – $43,4 \pm 5$ нг · ч/мл за аналогичный период. Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» для таблеток 30 мг примерно в 3,9 раза превышает аналогичную площадь под кривой для таблеток пролонгированного действия 10 мг, что свидетельствует о тенденции к линейному увеличению концентраций препарата при повышении дозы. Таким образом, можно сделать вывод о сопоставимых фармакокинетических свойствах препарата «Морфина гидрохлорид» отечественного производства и зарубежного препарата «Морфина сульфат». S. P. Baillie et al дополнительно было показано, что эквивалентные дозы морфина приводят к более высоким концентрациям в плазме у пожилых людей по сравнению с молодыми, перорально или в таблетках с замедленным высвобождением, что связано со сниженным метаболизмом при первом прохождении через печень и сниженным клиренсом в пожилой группе; что также можно наблюдать и в популяции включенных в исследование MRPH-04-17 онкологических пациентов с учетом среднего возраста участвовавших в исследовании пациентов (57 лет) и предшествующей перенесенной противоопухолевой терапии (потенциально гепато- и нефротоксичной) [13].

J. DRAKE et al провели изучение относительной биодоступности и изучили фармакокинетические профили пролонгированных форм морфина после приема препаратов Oramorph SR (OSR) и MST Continus (MST) в дозе 30 мг. Оценку проводили в ходе рандомизированного перекрестного исследования с участием 24 здоровых добровольцев мужского пола, получавших однократные пероральные (30 мг) дозы препаратов морфина натошак или после обильного завтрака. По результатам исследования было выявлено, что средние значения C_{max} , T_{max} , AUC_{0-24} были значительно выше у пациентов, получивших обильный завтрак по сравнению с субъектами, которые получали препараты натошак (таблица 1) [14].

Сравнительный анализ фармакокинетических данных в работе J. DRAKE et al, полученных на здоровых добровольцах и данных, полученных в ходе нашего исследования (MRPH-04-17), подтверждают сопоставимость фармакокинетических профилей различных препаратов морфина с учетом разности возрастов (более возрастная популяция в исследовании MRPH-04-17) и связанными с этим более высокими концентрациями морфина в плазме крови [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате изучения фармакокинетики установлено, что препарат «Морфина гидрохлорид» (таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 30 мг) обнаруживается в плаз-

Таблица 1. Сравнение усредненных значений фармакокинетических параметров после приема препаратов морфина, полученных при проведении клинических исследований по протоколам MRPH-04-17 ($M \pm SD$) и MRPH-09-16 ($M \pm SD$)

Table 1. Comparison of the average values of pharmacokinetic parameters after taking morphine preparations obtained during clinical trials using protocols MRPH-04-17 ($M \pm SD$) and MRPH-09-16 ($M \pm SD$)

Препарат/ ФК показатель	Морфина гидрохлорид, таблетки 30 мг пролонг (МЭЗ) (12 часов). Протокол исследования MRPH-04-17 ($M \pm SD$)		Морфина гидрохлорид, таблетки 10 мг короткого действия (8 часов). Протокол исследования MRPH-09-16 ($M \pm SD$)		МСТ континус, $M \pm SEM$ (10 мг, 12 часов)		Раствор для приема внутри $M \pm SEM$ (10 мг, 12 часов)	
	Однократный прием	Множественный прием (день 10)	Однократный прием	Множественный прием	Молодые	Пожилые	Молодые	Пожилые
C_{max}	30,67 \pm 14,43	39,21 \pm 27,1	27,08 \pm 21,76	37,72 \pm 19,22	5,5 \pm 0,4	8,1 \pm 1,0	10,8 \pm 1,4	20,9 \pm 3,7
T_{max}	2,58 \pm 2,43	2,63 \pm 1,43	1,8 \pm 1,77	1,01 \pm 0,48	3,9 \pm 1,2	2,7 \pm 0,4	0,7 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2
AUC_{0-t}	170,27 \pm 88,49	211,9 \pm 135,75	71,76 \pm 53,41	142,25 \pm 81,74	28,0 \pm 3	43,4 \pm 5	26,2 \pm 2,7	61,7 \pm 16,3
$T_{1/2}$	4,28 \pm 1,77	14,46 \pm 30,86	3,29 \pm 3,96	4,26 \pm 1,37	–	–	–	–

ме крови после приема внутрь через 15 минут. Максимальной концентрации в крови достигается через 3 часа, период полувыведения составляет в среднем 9 часов, максимальная концентрация составляет 36,52 нг/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 14 апреля 2015 г. № 187н «Об утверждении Порядка оказания паллиативной медицинской помощи взрослому населению» Рекомендации Европейской ассоциации паллиативной помощи: «Белая книга: стандарты и нормы хосписной и паллиативной помощи».
2. Абузарова Г. Р., Алексеева Г. С., Нигматуллина З. Ш., Кузнецов С. В. Доступность наркотических анальгетиков для терапии болевого синдрома в онкологии. *Российский журнал боли*. 2013; 3: 48–54.
3. Федеральный закон 361-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 [Распоряжение Правительства РФ от 01.07.2016 № 1403-р «об утверждении плана мероприятий («дорожной карты») «повышение доступности наркотических средств и психотропных веществ для использования в медицинских целях»].
4. Невзорова Д. В., Абузарова Г. Р. Клинические рекомендации: хронический болевой синдром у взрослых пациентов, нуждающихся в паллиативной медицинской помощи. *Терапия*. 2017; 32: 69–75.
5. Абузарова Г. Р., Алексеева Г. С., Сарманаева Р. Р., Душакова Л. В. Современные возможности импортозамещения в лечении болевых синдромов у онкологических больных. *Исследования и практика в медицине*. 2014; 1(1): 8–15.
6. Палехов А. В., Введенская Е. С. Опиоидные анальгетики в терапии хронической боли: проблемы и перспективы. *Российский журнал боли*. 2015; 40(3): 56–63.
7. Berezikova O., Usenko O., Berezikov V., Sharafutdinov M. Access to Opioids in Two Regions of Russia. *Palliat. Med.* 2012; 26(4): 458–6.
8. Dowell D., Haegerich T. M., Chou R. CDC Guideline for Prescribing Opioids for Chronic Pain United States. *JAMA*. 2016; 315(15): 1624–1645. Doi: 10.1001/jama.2016.1464.
9. Mercadante S. Pharmacotherapy for breakthrough cancer pain. *Drugs*. 2012; 72(2): 181–90. Doi: 10.2165/11597260-000000000-00000.8.
10. Лебедева М. В., Кононова С. В. Фармакоэкономическое обоснование выбора пролонгированной лекарственной формы морфина для купирования хронического болевого синдрома у онкологических больных. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2016; 11(3(63)): 58–61.
11. Liao Q., Deng Y., Xie Z., Pan B., Zhang L. Rapid simultaneous determination of codeine and morphine in plasma using LC-ESI-MS/MS: application to a clinical pharmacokinetic study. *J Sep Sci*. 2009; 32(2): 202–211.
12. Ghassabian S., Moosavi S. M., Valero Y. G., Shekar K., Fraser J. F., Smith M. T. High-throughput assay for simultaneous quantification of the plasma concentrations of morphine, fentanyl, midazolam and their major metabolites using automated SPE coupled to LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012; 903: 126–133.
13. Baillie S. P., Bateman D. N., Coates P. E., Woodhouse K. W. Age and the Pharmacokinetics of Morphine. *Age and Ageing*. 1989; 18(4): 258–262. Doi: 10.1093/ageing/18.4.258.

14. Drake J., Kirkpatrick C. T., Aliyar C. A., Crawford F. E., Gibson P., Horth C. E. Boehringer Ingelheim Ltd, Bracknell. Charterhouse Clinical Research Unit, The Royal Masonic Hospital, London, 3Ethical Pharmaceuticals Ltd, Ely, Bioanalytical Research Ltd, Ely and 5Biomedical Consultant, Cytops, High Wycombe, UK.

REFERENCES

1. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated April 14, 2015 No. 187n «On approval of the Procedure for the provision of palliative care for adults» Recommendations of the European Association of Palliative Care: «White Paper: standards and norms of hospice and palliative care» (in Russ.).
2. Abuzarova G. R., Alekseeva G. S., Nigmatullina Z. Sh., Kuznetsov S. V. Availability of narcotic analgesics for the treatment of pain in Oncology. *Russian journal of pain*. 2013; 3: 48–54 (in Russ.).
3. Federal law 361-FZ «On circulation of medicines» of 12.04.2010 [Order of the government of the Russian Federation of 01.07.2016 n 1403-R «on approval of the action plan («road map») «increasing the availability of narcotic drugs and psychotropic substances for medical use»] (in Russ.).
4. Nevzorova D. V., Abuzarova G. R. Clinical guidelines: chronic pain syndrome in adult patients requiring palliative care. *Therapy*. 2017; 32: 69–75. (in Russ.).
5. Abuzarova G. R., Alekseeva G. S., Sarmanaeva R. R., Dushakova L. V. Modern possibilities of import substitution in the treatment of pain syndrome in cancer patients. *Research'n Practical Medicine Journal*. 2014; 1(1): 8–15. (in Russ.).
6. Palekhov A. V., Vvedenskaya E. S. Opioid analgesics in the therapy of chronic pain: Problems and Promises. *Russian Journal of Pain*. 2015; 40(3): 56–63 (in Russ.).
7. Berezikova O., Usenko O., Berezikov V., Sharafutdinov M. Access to Opioids in Two Regions of Russia. *Palliat. Med.* 2012; 26(4): 458–6.
8. Dowell D., Haegerich T. M., Chou R. CDC Guideline for Prescribing Opioids for Chronic Pain United States. *JAMA*. 2016; 315(15): 1624–1645. Doi: 10.1001/jama.2016.1464.
9. Mercadante S. Pharmacotherapy for breakthrough cancer pain. *Drugs*. 2012; 72(2): 181–90. Doi: 10.2165/11597260-000000000-00000.8.
10. Lebedeva M. V., Kononova S. V. Pharmacoeconomical explanation for choosing a prolonged formulation of morphine to reduce chronic pain syndrome in oncologic patients. *Bashkortostan Medical Journal*. 2016; 11(3(63)): 58–61 (in Russ.).
11. Liao Q., Deng Y., Xie Z., Pan B., Zhang L. Rapid simultaneous determination of codeine and morphine in plasma using LC-ESI-MS/MS: application to a clinical pharmacokinetic study. *J Sep Sci*. 2009; 32(2): 202–211.
12. Ghassabian S., Moosavi S. M., Valero Y. G., Shekar K., Fraser J. F., Smith M. T. High-throughput assay for simultaneous quantification of the plasma concentrations of morphine, fentanyl, midazolam and their major metabolites using automated SPE coupled to LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012; 903: 126–133.
13. Baillie S. P., Bateman D. N., Coates P. E., Woodhouse K. W. Age and the Pharmacokinetics of Morphine. *Age and Ageing*. 1989; 18(4): 258–262. Doi: 10.1093/ageing/18.4.258.
14. Drake J., Kirkpatrick C. T., Aliyar C. A., Crawford F. E., Gibson P., Horth C. E. Boehringer Ingelheim Ltd, Bracknell. Charterhouse Clinical Research Unit, The Royal Masonic Hospital, London, 3Ethical Pharmaceuticals Ltd, Ely, Bioanalytical Research Ltd, Ely and 5Biomedical Consultant, Cytops, High Wycombe, UK.

Оригинальная статья/Research article

Результаты оценки биоподобия препаратов РинЛиз® (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и Хумалог® («Лилли Франс», Франция) с использованием метода гиперинсулинемического эугликемического клэмпа на здоровых добровольцах

А. Ю. Майоров¹, И. А. Федотов^{2,3}, Р. В. Драй⁴, О. И. Авдеева⁴, И. Е. Макаренко^{4*}

1 – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России (ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России), 117036, Россия, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11

2 – ООО «БиоЭк», 197342, Россия, г. Санкт-Петербург, Красногвардейский переулок, д. 23, лит. Ж

3 – ООО «Научно-исследовательский центр Эко-безопасность», 191119, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Достоевского, д. 44

4 – ООО «ГЕРОФАРМ», 191144, Россия, г. Санкт-Петербург, административно-деловой квартал «Невская Ратуша», Дегтярный переулок, д. 11Б

*Контактное лицо: Макаренко Игорь Евгеньевич. E-mail: igor.makarenko@gropharm.com

Статья получена: 25.02.2020. Статья принята к печати: 08.04.2020

Резюме

Введение. Инсулин является наиболее действенным гипогликемическим средством, применяемым в настоящее время в клинической практике. По сравнению с рекомбинантным человеческим инсулином, инсулин лизпро демонстрирует профиль уровня глюкозы в крови, значительно более близкий к физиологическому. В программу клинических исследований (КИ) биоаналогов инсулина входят исследования фармакологии: фармакокинетики (ФК), фармакодинамики (ФД), и исследование клинической безопасности.

Цель. Продемонстрировать, что препарат РинЛиз®, раствор для внутривенного и подкожного введения, 100 МЕ/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и Хумалог®, раствор для внутривенного и подкожного введения, 100 МЕ/мл («Лилли Франс», Франция) имеют сопоставимые ФК и ФД профили в условиях эугликемического гиперинсулинемического клэмпа на здоровых добровольцах.

Материалы и методы. Исследование было проведено как двойное слепое перекрестное исследование ФК и ФД с участием 28 здоровых добровольцев (NCT03604575). Исследуемые препараты (ИП) вводили перед клэмпом в дозе 0,3 МЕ/кг однократно подкожно в область подкожно-жировой клетчатки передней брюшной стенки. В течение исследования проводили регулярный забор крови, в образцах определяли количество инсулина лизпро методом иммуноферментного анализа. Результаты определения использованы для расчета ФК параметров и построения кривых «концентрация – время». На основании измерения гликемии корректировали скорость инфузии глюкозы. Эти данные использованы для расчета ФД параметров. Сопоставимость ИП считалась доказанной, если 90%-ые доверительные интервалы (ДИ) для отношения геометрических средних ФК параметров $C_{ins,max}$ и $AUC_{ins,0-8}$ и 95%-ые ДИ для отношения геометрических средних ФД параметров GIR_{max} и $AUC_{GIR0-8,5}$ находились в пределах 80–125 %. Статистическая обработка данных и оформление результатов проводилось с помощью пакетов программного обеспечения R 3.4.2.

Результаты и обсуждения. В ходе проведенного КИ сравнительной ФК и ФД препаратов РинЛиз® и Хумалог® установлено, что они имеют сопоставимые ФК и ФД профили. ДИ для логарифмически преобразованных отношений значений ФК параметров составили $C_{ins,max}$ 85,99–96,85 % и $AUC_{ins,0-8}$ 90,58–97,28 %, для ФД параметров 95,64–118,94 для GIR_{max} и 96,5–121,36 для $AUC_{GIR0-8,5}$. Все ДИ соответствуют заданным границам 80–125 % для установления сопоставимости между препаратом РинЛиз® и оригинальным препаратом.

Заключение. Полученные данные демонстрируют биосимилярность инсулина РинЛиз® оригинальному препарату Хумалог® по ФК, ФД показателям и по параметрам безопасности.

Ключевые слова: инсулин лизпро, биосимиляр, клиническое исследование, фармакокинетика, фармакодинамика, сопоставимость, клэмп.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. А. Ю. Майоров осуществлял научное руководство клиническим исследованием. И. А. Федотов являлся главным исследователем. Все авторы проводили интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Благодарность. Спонсор данного клинического исследования – ООО «ГЕРОФАРМ».

Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации, принципами Надлежащей клинической практики и локальными регуляторными требованиями. Протокол исследования был одобрен Министерством здравоохранения РФ (разрешение № 483 от 04.09.2015), а также независимым этическим комитетом при клиническом центре.

Для цитирования: Майоров А. Ю., Федотов И. А., Драй Р. В., Авдеева О. И., Макаренко И. Е. Результаты оценки биоподобия препаратов РинЛиз® (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и Хумалог® («Лилли Франс», Франция) с использованием метода гиперинсулинемического эугликемического клэмпа на здоровых добровольцах. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 124–131.

Results of the Estimation of Biosimilarity of RinLiz® (LLC «GEROPHARM», Russia) and Humalog® (Lilly France, France) Using the Method of the Hyperinsulinemic Eulglycemic Clamp on Healthy Voluntary

Alexander Yu. Mayorov¹, Ivan A. Fedotov^{2,3}, Roman V. Drai⁴, Olga I. Avdeeva⁴, Igor E. Makarenko^{3*}

1 – Endocrinology Research Centre, 11, Dmitry Ulyanov str., Moscow, 117036, Russia

2 – LLC «BioEk», 23Zh, Krasnogvardeysky lane, Saint-Petersburg, 197342, Russia

3 – LLC «Eco-Safety Research Center», 44, Dostoevsky str., Saint-Petersburg, 191119, Russia

4 – LLC «GEROPHARM», 11B, Degtyarny side str., administrative and business district «Nevskaya Ratusha», 191144, Russia

*Corresponding author: Igor E. Makarenko. E-mail: igor.makarenko@gropharm.com

Received: 25.02.2020. Accepted: 08.04.2020

© Майоров А. Ю., Федотов И. А., Драй Р. В., Авдеева О. И., Макаренко И. Е., 2020

© Mayorov A. Yu., Fedotov I. A., Drai R. V., Avdeeva O. I., Makarenko I. E., 2020

Abstract

Introduction. Insulin is the most effective hypoglycemic agent currently used in the clinical practice. Compared with recombinant human insulin, insulin lispro have a blood glucose profile that is much closer to physiological. The clinical trials program of insulin bioassays includes pharmacology studies: pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD), and a clinical safety study.

Aim. To compare PK and PD of RinLiz® U100, solution for intravenous and subcutaneous administration (LLC «GEROFARM», Russia) and Humalog® U100, solution for intravenous and subcutaneous administration (Lilly France, France) in hyperinsulinemic euglycemic clamp.

Materials and methods. This was randomized double-blind, two-arm crossover study in 28 healthy volunteers (NCT03604575). The studied preparations were injected before the clamp with a dose of 0.3 U/kg once subcutaneously in the area of subcutaneous fat in the anterior abdominal wall. During the study, regular blood sampling was performed; the amount of insulin lispro was determined by ELISA in the samples. The results of the determination were used to calculate the PK parameters and construct the curves «concentration – time». Based on the measurement of glycemia, the glucose infusion rate was adjusted. These data were used to calculate the PD parameters. The comparability of the studied drugs was considered proven if 90 % confidence intervals (CI) for the ratio of geometric mean PK parameters $C_{ins, max}$ and $AUC_{ins, 0-8}$ and 95 % CI for the ratio of geometric mean PD parameters GIR_{max} and $AUC_{GIR0-8,5}$ were in the range of 80–125 %. Statistical data processing and presentation of the results was carried out using software packages R 3.4.2.

Results and discussion. In the course of CI comparative PK and PD of RinLiz® and Humalog®, it was revealed that they have comparable PK and PD profiles. The CI for the logarithmically converted ratios of the values of the PK parameters was $C_{ins, max}$ 85.99–96.85 % and $AUC_{ins, 0-8}$ 90.58–97.28 %, the PD of the parameters were 95.64–118.94 for GIR_{max} and 96.5–121.36 for $AUC_{GIR0-8,5}$, all the CIs correspond to the set the boundaries of 80–125 % to establish comparability between RinLiz® and the original drug.

Conclusion. The results demonstrated the high degree of similarity of RinLiz® U100 and Humalog® U100 in terms of PK, PD profiles and safety.

Keywords: Insulin lispro, biosimilar, clinical trials, pharmacokinetics, pharmacodynamics, comparability, clamp.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Alexander. Yu. Mayorov supervised the clinical study. Ivan A. Fedotov was the main researcher. All authors interpreted the results. All authors participated in the discussion of the results and the writing of the text of the article.

Acknowledgment. The sponsor of this clinical trial is LLC «GEROPHARM».

The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association, the principles of Good Clinical Practice and local regulatory requirements. The study protocol was approved by the Ministry of Health of the Russian Federation (permission No. 483 dated 09/04/2015), as well as by an independent ethics committee at the clinical center.

For citation: Mayorov A. Yu., Fedotov I. A., Draï R. V., Avdeeva O. I., Makarenko I. E. Results of the estimation of biosimilarity of RinLiz® (LLC «GEROPHARM», Russia) and Humalog® (Lilly France, France) using the method of the hyperinsulinemic euglycemic clamp on healthy voluntary. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 124–131.

ВВЕДЕНИЕ

Инсулин лизпро является первым выведенным на фармацевтический рынок аналогом инсулина [1, 2]. Молекулярная структура инсулина лизпро идентична таковой для человеческого инсулина за исключением позиций 28 и 29 β-цепи молекулы, где лизин и пролин расположены в обратном порядке. Обратное расположение лизина и пролина позволяет молекуле инсулина лизпро диссоциировать в два раза быстрее чем человеческий инсулин, что обеспечивает более быстрое проникновение в кровь и, как следствие, начало действия. Таким образом, инсулин лизпро имеет кривую снижения уровня глюкозы в крови практически идентичную профилю активности эндогенного инсулина, поступающего в кровоток после приема пищи. Благодаря этому у пациентов оптимизируется гликемический контроль и снижается риск развития гипогликемии, которая наблюдается при использовании инсулина лизпро на 30 % реже по сравнению с рекомбинантными инсулинами [1, 2].

В связи с востребованностью данного инсулина, представляется целесообразным уделение особого внимания доказательству сопоставимости его биосимиляров. Одним из завершающих этапов программы оценки сопоставимости является проведение клинического исследования методом гиперинсулинемического эугликемического клэмпа (ГЭК) [3]. Этот метод по-

зволяет измерять количество глюкозы, необходимое для поддержания эугликемии после экзогенного введения инсулина. Фармакологическое действие препарата инсулина в этом методе определяют за счет анализа профиля «время – действие», базируясь на скорости инфузии глюкозы (СИГ – GIR – glucose infusion rate) как суррогатном показателе фармакодинамики (ФД), а также на основании профилей экзогенной концентрации препарата инсулина в плазме в качестве фармакокинетических (ФК) показателей [4–6].

Отечественное производство позволяет увеличить надежность обеспечения больных препаратами, увеличить конкуренцию производителей и, в итоге, повысить доступность препаратов инсулина для людей, страдающих сахарным диабетом. В связи с этим фармацевтическая компания ООО «ГЕРОФАРМ» разработала биоаналог оригинального препарата Хумалог®. Биоаналог – это биологический лекарственный препарат, идентичный по параметрам качества, эффективности и безопасности с референтным биологическим лекарственным препаратом в такой же лекарственной форме и имеющий идентичный способ введения [7].

В соответствии с российским законодательством и международными нормами [8–15] программа доказательства биосимилярности включает: исследования физико-химических свойств, *in vitro* биологическую активность (включая сравнительное исследование аффинности к обоим инсулиновым рецепторам), а также

клинические исследования ФК, и ФД, и исследования клинической безопасности (иммуногенности).

Для изучения фармакологических свойств препаратов инсулина в соответствии с российскими и международными рекомендациями [8, 14, 15] используется метод ГЭК. Это связано с тем, что сравнительное изучение ФК/ФД свойств с помощью ГЭК обладает высокой чувствительностью для выявления возможных различий оригинального препарата и его биоаналога [8, 9].

ЦЕЛЬ

Продemonстрировать, что препарат РинЛиз®, раствор для внутривенного и подкожного введения, 100 МЕ/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и Хумалог®, раствор для внутривенного и подкожного введения, 100 МЕ/мл («Лилли Франс», Франция) имеют сопоставимые ФК и ФД профили в условиях ГЭК на здоровых добровольцах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на базе клинического центра ООО «БиоЭк», Санкт-Петербург.

Дизайн исследования: исследование было проведено как двойное слепое перекрестное исследование ФК и ФД с участием 28 здоровых добровольцев (NCT03604575).

Исследование было проведено на добровольцах мужского пола в возрасте от 18 до 50 лет (включительно) европеоидной расы, с индексом массы тела 18,5–27 кг/м² с верифицированным диагнозом «здоров» по данным стандартных клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования. Основными критериями невключения были: эпизоды гипогликемии в анамнезе или наличие в семейном анамнезе случаев верифицированного диагноза сахарный диабет у ближайших родственников; уровень глюкозы в плазме натощак $\geq 6,1$ ммоль/л; уровень HbA_{1c} $> 6\%$; уровень глюкозы в плазме $\geq 7,8$ ммоль/л через 2 часа после нагрузки глюкозой в ходе перорального глюкозотолерантного теста.

До начала процедур исследования (включая скрининг) каждый доброволец подписал информированное согласие. Добровольцы, соответствующие критериям включения/невключения, были рандомизированы в исследование.

Каждый доброволец прошел 5 визитов с периодом «отмывки». Визит 1 – скрининг. Визит 2 – исследовательский период I – ГЭК с подкожной инъекцией исследуемого препарата (ИП) в дозе 0,3 МЕ/кг. Период «отмывки» – 14 дней после окончания первого ГЭК. Визит 3 – повторный сокращенный скрининг – оценка пригодности пациента для второго периода исследования. Визит 4 – исследовательский период II – ГЭК с подкожной инъекцией ИП в дозе 0,3 МЕ/кг. Визит 5 – заключительный визит безопасности.

Рандомизацию осуществляли непосредственно на базе клинического центра с помощью метода кон-

вертов. Первая группа (TR) получила во время первого периода тестируемый препарат, а во время второго периода – препарат сравнения. Вторая группа (RT) наоборот – во время первого периода получила препарат сравнения, а во время второго периода – тестируемый препарат. Очередность периодов была неизвестна для добровольца и исследователей.

Процедуру ГЭК проводили натощак с периодом голодания не менее 12 часов до инъекции ИП. Перед началом процедуры ГЭК осуществляли физикальный осмотр добровольцев для выявления отклонений в состоянии здоровья и забирали кровь на ФК, и определение базального уровня глюкозы в крови. При соответствии уровня глюкозы в крови целевому диапазону (4,4–5,6 ммоль/л) в течение 1 часа до инъекции ИП такой доброволец проходил процедуру ГЭК после однократной подкожной инъекции ИП в дозе 0,3 МЕ/кг в область подкожно-жировой клетчатки передней брюшной стенки. При регистрации начала действия препарата начинали управляемую инфузию раствора глюкозы для поддержания целевого уровня глюкозы в плазме 4,4–5,6 ммоль/л (80–100 мг/дл). Контроль и коррекцию СИГ производили каждые 5 минут в течение всего исследования.

Фармакокинетика. Для получения первичных данных по ФК отбор крови для определения концентрации инсулина лизпро в крови производили за 60, 30 минут непосредственно до введения ИП и после введения ИП по следующей схеме: до точки 3 часа отбор осуществляли каждые 15 минут, до точки 6 часов каждые 30 минут и до точки 8 часов (окончания ГЭК) каждый час. Общая продолжительность наблюдения составила 8 часов.

Количественное определение инсулина лизпро проводили методом ИФА, предполагающим использование технологии двойного измерения, включающей:

- 1) неспецифическое детектирование суммарного уровня инсулина лизпро и инсулина человеческого с помощью коммерчески доступных ИФА наборов Mercodia Isoinsulin ELISA;
- 2) специфическое детектирование инсулина человеческого с помощью коммерчески доступных ИФА наборов Mercodia Insulin ELISA.

Определение уровня С-пептида также проводили методом ИФА, используя коммерчески доступные наборы Mercodia C-peptide ELISA.

Предварительно аналитическая методика анализа была валидирована по следующим тестам: селективность, калибровочный график, правильность и прецизионность внутри и между испытаниями, внутрисерийная правильность образцов контроля качества, межсерийная прецизионность и правильность образцов контроля качества, допустимость разведения, параллелизм, специфичность, стабильность растворов.

Для сравнительной оценки ФК профилей ИП были проанализированы конечные точки. Первичные точки: суммарная площадь под кривой (AUC) «концентрация

исследуемого инсулина – время» в интервале времени от 0 до 8 ч ($AUC_{ins, 0-8}$), максимальная концентрация инсулина в крови за период наблюдения ($C_{ins, max}$). Вторичные точки: $AUC_{ins, 0-2}$, $AUC_{ins, 0-\infty}$, время достижения максимальной концентрации инсулина (t_{max}), период полувыведения инсулина ($t_{1/2}$).

Фармакодинамика. Для получения первичных данных по ФД использовали определение СИГ (GIR). В свою очередь, уровень глюкозы в крови измеряли каждые 5 минут с помощью высокоточного глюкометра StatStrip производства Nova Biomedical [16, 17].

Оценивали: первичные конечные точки – суммарная площадь под кривой «скорость инфузии глюкозы – время» в интервале времени от 0 до 8,5 ч ($AUC_{GIR 0-8,5}$) и максимальная СИГ за период исследования (GIR_{max}), и вторичные точки: частичные площади под кривыми $AUC_{GIR 0-1}$, $AUC_{GIR 0-2}$, время достижения максимальной СИГ ($tGIR_{max}$), время между введением ИП и началом инфузии глюкозы ($tGIR_{lag}$).

Для подтверждения факта угнетения выброса эндогенного инсулина на фоне подкожного введения ИП осуществляли отбор образцов крови на уровень С-пептида в плазме до введения ИП и далее каждые 2 часа.

Безопасность. Проводили оценку частоты и тяжести возникновения нежелательных явлений (НЯ), отклонения от нормы жизненно важных показателей (ЖВП): артериального давления (АД), частоты сердечных сокращений (ЧСС), частоты дыхательных движений (ЧДД), температуры тела, частоты возникновения местных реакций в месте инъекции, уровня калия в крови, отклонения от нормы лабораторных показателей и ЭКГ.

Методы статистического анализа данных. Статистическая обработка данных и оформление результатов проведено с помощью пакетов программного обеспечения R 3.4.2. Площадь под кривой рассчитывали методом трапеций.

Дисперсионный анализ (ANOVA) был проведен для логарифмически преобразованных первичных ФК ($C_{ins, max}$ и $AUC_{ins, 0-8}$) и ФД (GIR_{max} и $AUC_{GIR 0-8,5}$) параметров.

Вывод о биоподобии сравниваемых препаратов был сделан с использованием подхода, основанного на оценке 90%-ых и 95%-ых доверительных интервалов (ДИ) для отношений средних геометрических значений соответственно ФК и ФД параметров ИП. Препараты биоподобны, если границы оцененных ДИ интервалов находятся в пределах 80–125% [9, 14, 15].

Для первичных и вторичных ФК и ФД параметров, а также для показателей безопасности были рассчитаны и зарегистрированы показатели описательной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После прохождения скрининга в исследование было включено 28 здоровых добровольцев, соответствующих критериям включения/невключения. Характеристика группы представлена в таблице 1. Статистически значимых различий в демографических и антропометрических данных между рандомизированными группами на этапе включения выявлено не было. В анализ данных были включены данные всех добровольцев.

Таблица 1. Демографическая и антропометрическая информация о субъектах (среднее \pm стандартное отклонение)

Table 1. Demographic and anthropometric subject information (mean \pm standard deviation)

Показатель	Группа TR (N = 14)	Группа RT (N = 14)	Всего (N = 28)	p-value
Масса тела (кг)	78,71 \pm 7,42	75,66 \pm 6,16	77,18 \pm 6,87	>0,05 ^a
Рост (см)	180,43 \pm 8,42	176,29 \pm 5,36	178,36 \pm 7,24	>0,05 ^b
ИМТ (кг/м ²)	24,17 \pm 1,44	24,33 \pm 1,58	24,25 \pm 1,49	>0,05 ^a
Возраст (лет)	23,29 \pm 2,33	24,57 \pm 3,63	23,93 \pm 3,07	>0,05 ^b

Примечания: ^at-критерий Стьюдента; ^bU-критерий Манна – Уитни.

Notes: ^aStudent's t-test; ^bMann-Whitney U-test.

Динамика изменений уровня С-пептида для подтверждения подавления выработки эндогенного инсулина в ответ на внутривенное введение раствора глюкозы была проанализирована для каждой группы в оба периода ГЭК (таблица 2).

Таблица 2. Динамики уровня С-пептида [рМ, медиана (межкварт. интервал)]

Table 2. The dynamics of the level of C-peptide [pM, median (interquart. Interval)]

Период	Группа	0 мин	120 мин	240 мин	360 мин	480 мин
1	TR	339 [266; 401]	404 [334; 487]	519 [294; 765]	482 [358; 744]	308,5 [266; 458]
	RT	410 [396; 433]	475 [196; 643]	585 [236; 711]	415 [327; 551]	390 [304; 449]
Сравнение групп TR – RT: p-value (тест Манна – Уитни)		0,19	0,88	0,92	0,39	0,64
2	TR	385 [302; 439]	344 [244; 524]	509,5 [306; 567]	450 [289; 499,5]	323 [274; 384,5]
	RT	392,5 [284; 466]	418 [336; 575]	613 [511; 666]	551 [459; 665]	385 [298; 512]
Сравнение групп TR – RT: p-value (тест Манна – Уитни)		0,94	0,39	0,13	0,03	0,24

Результаты измерения уровня С-пептида, полученные до введения ИП и после введения во всех временных точках, предусмотренных протоколом, были сопоставимы между исследуемыми группами добровольцев, за исключением точки 360 мин во время 2-го периода (p -value = 0,03, медиана составила 450 [289; 499,5] в группе TR и 551 [459; 665] в группе RT). Оценка полученных результатов позволила предположить клиническую незначимость выявленных межгрупповых и внутригрупповых различий, так как показатели обеих групп во всех временных точках в оба периода ГЭК находились в пределах нормальных значений 298–2350 pM, кроме того индивидуальные значения добровольцев не превысили верхней границы нормы, что позволило сделать заключение об отсутствии выработки эндогенного инсулина в ответ на внутривенное введение раствора глюкозы, тем самым подтверждая удовлетворительное качество проведения ГЭК.

На рисунке 1 и в таблице 3 представлены усредненные ФК кривые «концентрация – время» тестируемого и референтного препарата в плазме крови добровольцев.

Отношения средних значений логарифмически преобразованных основных ФК параметров ИП, $C_{ins. max}$ и $AUC_{ins. 0-8}$ составили 91,3 [85,99–96,85] % и 93,9 [90,58–97,28] %, соответственно. Оба параметра находятся в пределах допустимых границ 80–125 %, что говорит о биосимилярности ИП по данному показателю.

На рисунке 2 и в таблице 4 представлены усредненные ФД кривые «скорость инфузии глюкозы – время».

В ходе оценки ФД показателей была отмечена сопоставимость параметров действия тестируемого и референтного препаратов.

Отношения средних значений логарифмически преобразованных основных ФД параметров ИП, GIR_{max} и $AUC_{GIR 0-8,5}$ составили 1,067 [95,64–118,94] % и 1,082 [96,5–121,36] % соответственно. Оба параметра находятся в пределах допустимых границ 80–125 %, что говорит о биосимилярности ИП по данному показателю.

В отношении вторичных ФД показателей также были получены аналогичные результаты. Так, время между введением ИП и началом инфузии глюкозы ($tGIR_{lag}$)

График концентраций

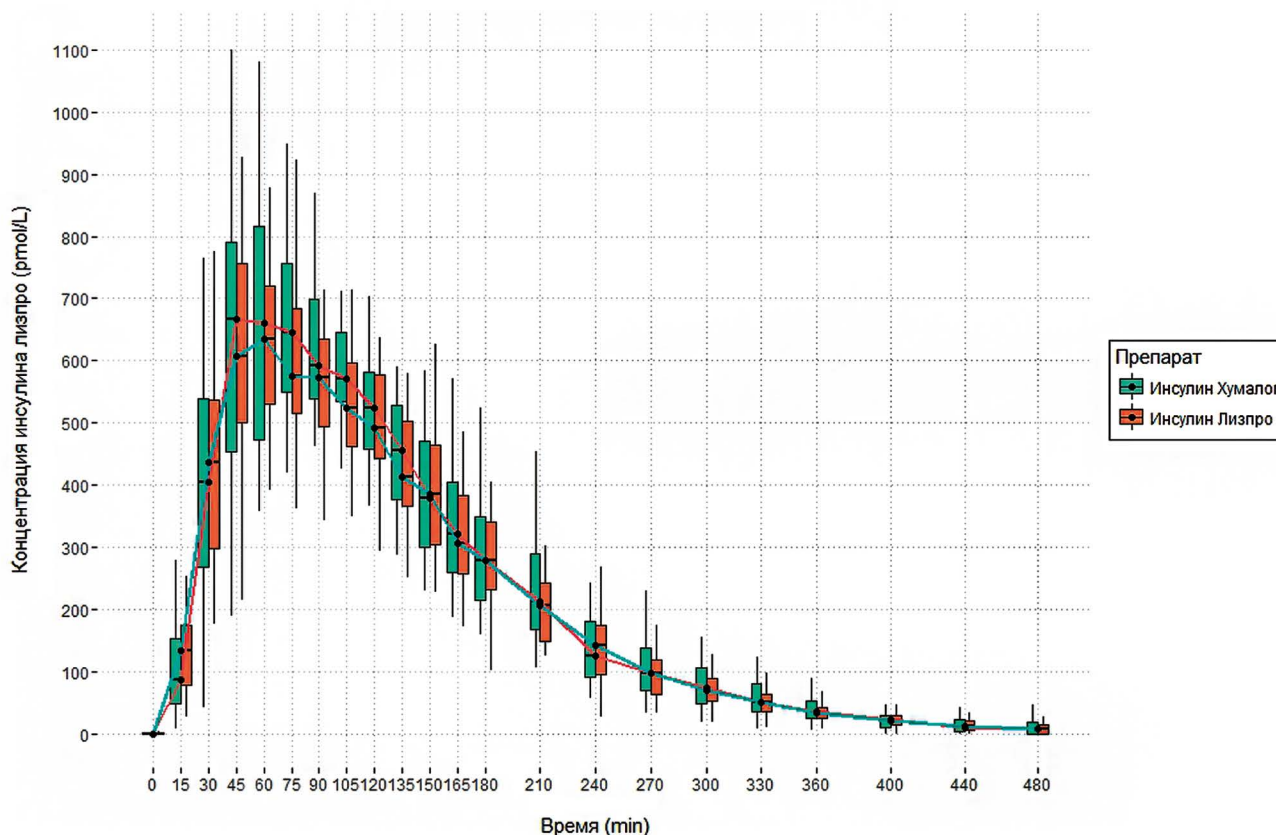


Рисунок 1. Усредненные фармакокинетические кривые «концентрация – время» тестируемого препарата РинЛиз® (Инсулин Лизпро) и препарата сравнения Хумалог®

Figure 1. Averaged pharmacodynamic curves «concentration – time» of the test drug RinLiz® (Insulin Lizpro) and the comparison drug Humalog®

Таблица 3. Фармакокинетические параметры исследуемых препаратов, результаты оценки эквивалентности

Table 3. Pharmacokinetic parameters of the studied drugs, the results of the equivalence assessment

	РинЛиз® (Т) ^а n = 28	Хумалог® (R) ^а n = 28	Отношение Т/R [90 % ДИ] ^б
C _{ins, max} , пмоль/л	678,43 ± 141,83	748,61 ± 182,61	91,3 [85,99–96,85]
AUC _{ins, 0-8ч} (пмоль/л) × мин	104802,59 ± 18271,68	111029,38 ± 15312,75	93,9 [90,58–97,28]
AUC _{ins, 0-2ч} (пмоль/л) × мин	57241,88 ± 11421,43	60001,07 ± 14334,43	
AUC _{0-8ч} (пмоль/л) × мин	105900,22 ± 18269,16	112233,13 ± 15614,12	
t _{max} , мин	67,5 ± 26,61	75,54 ± 26,29	
t _{1/2} , мин	58,21 ± 12,08	56,95 ± 19,31	

Примечания: ^а результаты представлены в виде среднего ± стандартное отклонение; ^б представлено отношение геометрических средних, для отношения ФК параметров приведен 90%-ый ДИ, для ФД – 95%-ый ДИ; с – результаты сравнения с помощью парного двустороннего t-критерия Стьюдента, для показателей t_{max} и t_{1/2} применялся парный двусторонний критерий Вилкоксона; различия между группами считали достоверными при p-value < 0,05.

Notes. ^a the results are presented as mean ± standard deviation; ^b the ratio of geometric means is presented, for the ratio of the FC parameters, a 90 % CI is given, for a FD – 95 % CI; c – comparison results using a paired two-tailed student t-test, for the indices t_{max} and t_{1/2}, a paired two-sided Wilcoxon test was used; differences between groups were considered significant at p-value < 0.05.

составило 18,75 ± 7,41 и 20,71 ± 9,50 минут соответственно. Также сопоставимыми были время достижения максимальной СИГ (tGIR_{max}) – т. е. время наступления максимального эффекта, изучаемых инсулинов и максимальная СИГ (GIR_{max}) – собственно максимальный эффект. tGIR_{max} составил 121,96 ± 61,32 и 135,54 ± 57,74 мин, GIR_{max} – 12,62 ± 4,61 и 12,09 ± 4,58 мг/кг/мин соответственно для тестируемого препарата и препарата сравнения.

В ходе проведения исследования серьезных нежелательных явлений не наблюдалось. Выявлено одно нежелательное явление, которое было классифицировано с помощью словаря MedDRA в группу нарушений «Инфекции неясной этиологии» (код

10021879). Нежелательное явление было оценено врачом-исследователем как легкой степени тяжести, завершилось полным выздоровлением. Связи нежелательного явления с препаратом исследователем установлено не было.

Отклонения в показателях клинического анализа крови [скорость оседания эритроцитов (СОЭ), количество лейкоцитов, нейтрофилы, лимфоциты] и жизненно важных показателей (тахикардия и повышение температуры тела) отмечены у одного добровольца и были обусловлены выявленным НЯ.

Уровень ионов калия в крови оставался стабильным в течение исследования. Местных реакций на введение ИП не обнаружено.

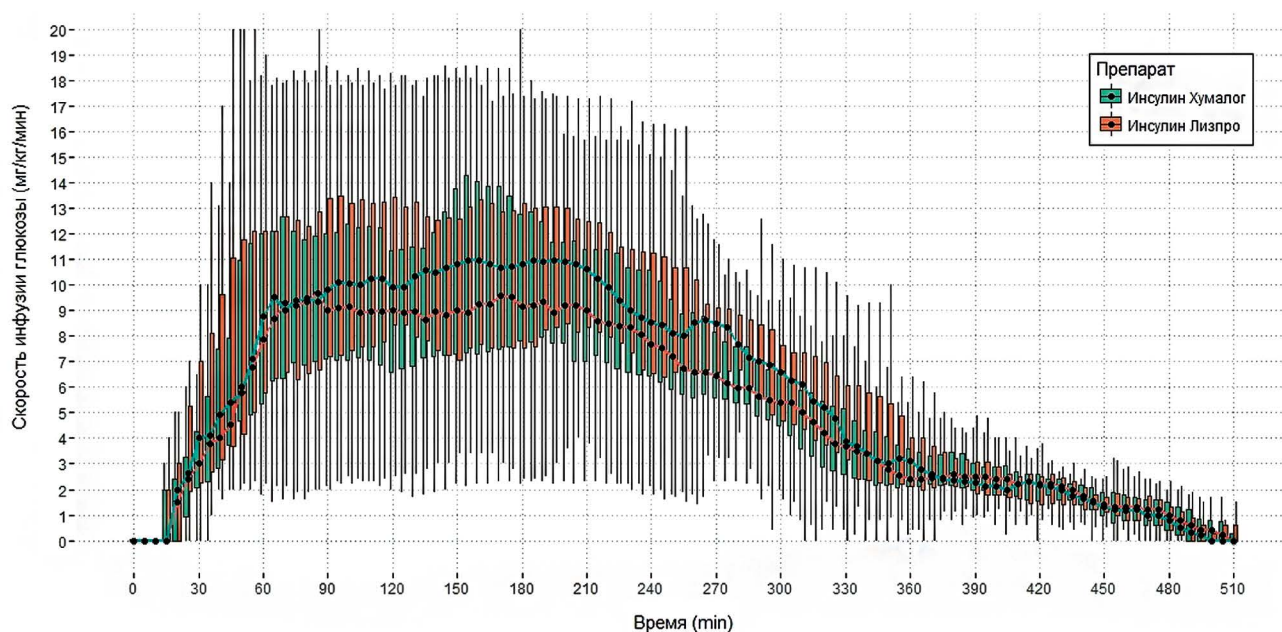


Рисунок 2. Усредненные фармакодинамические кривые «скорость инфузии глюкозы – время» тестируемого препарата РинЛиз® (Инсулин Лизпро) и препарата сравнения Хумалог®

Figure 2. Averaged pharmacodynamic curves «glucose infusion rate – time» of the tested drug RinLiz® (Insulin Lizpro) and the comparison drug Humalog®

Таблица 4. Фармакодинамические параметры исследуемых препаратов, результаты оценки эквивалентности

Table 4. Pharmacodynamic parameters of the studied drugs, the results of the equivalence assessment

	РинЛиз® (Т) ^а n = 28	Хумалог® (R) ^а n = 28	Отношение Т/R [95 % ДИ] ^б
GIR _{max} , мг/кг/мин	12,62 ± 4,61	12,09 ± 4,58	1,067 [95,64–118,94]
AUC _{GIR 0-8,5} , мг/кг	3076,91 ± 1086,49	2850,64 ± 996,67	1,082 [96,5–121,36]
AUC _{GIR 0-17} , мг/кг	259,3 ± 148,3	226,81 ± 126,15	
AUC _{GIR 0-27} , мг/кг	868,17 ± 387,11	790,52 ± 372,72	
tGIR _{max} , мин	121,96 ± 61,32	135,54 ± 57,74	
tGIR _{lag} , мин	18,75 ± 7,41	20,71 ± 9,50	

Примечания: ^а результаты представлены в виде среднего ± стандартное отклонение; ^б представлено отношение геометрических средних, для отношения ФК параметров приведен 90%-ый ДИ, для ФД – 95%-ый ДИ; с – результаты сравнения с помощью парного двустороннего t-критерия Стьюдента, для показателей t_{max} и t_{1/2} применялся парный двусторонний критерий Вилкоксона; различия между группами считали достоверными при p-value < 0,05.

Notes. ^a the results are presented as mean ± standard deviation; ^b the ratio of geometric means is presented, for the ratio of the FC parameters, a 90 % CI is given, for a FD – 95 % CI; c – comparison results using a paired two-tailed student t-test, for the indices t_{max} and t_{1/2}, a paired two-sided Wilcoxon test was used; differences between groups were considered significant at p-value < 0.05.

ГЭК – классический метод изучения фармакологии оригинальных и биоаналогичных препаратов инсулина [14, 18]. При данном исследовании на одной популяции одновременно анализируют зависимости «концентрация препарата – время» (ФК) и «скорость инфузии глюкозы – время» (эффект – время) (ФД), что позволяет сделать вывод о подобии или различии двух изучаемых препаратов инсулина.

При этом, стоит отметить, что СИГ – общепринятый суррогатный маркер, который непосредственно измеряет эффект препарата инсулина, заключающийся в утилизации экзогенно поступившей глюкозы [4–6, 19, 20]. Данный метод является высокочувствительным к возможным отличиям между препаратами. Прогностическая ценность определения СИГ на потенциальные клинические различия инсулинотерапии является выше, чем у гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) [8, 9, 14].

В ходе проведенного клинического исследования были оценены ФК и ФД показатели тестируемого препарата РинЛиз® в сравнительном аспекте с оригинальным препаратом Хумалог® в условиях ГЭК на здоровых добровольцах.

В соответствии с регуляторными требованиями [8, 9, 14, 15] статистическая оценка эквивалентности препаратов была проведена на основании соответствия 90%-ого ДИ отношения первичных ФК-конечных точек и 95%-ых ДИ отношения первичных ФД-параметров тестируемого препарата к препарату сравнения заранее определенным границам эквивалентности. Границами эквивалентности служили рекомендованные европейскими и отечественными требованиями к изучению биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный инсулин и аналоги инсулина 80–125 %. По результатам определения было установлено, что отношения средних значений логарифмически преобразованных основных ФК параметров ИП, C_{ins. max} и AUC_{ins. 0-8} составили 91,3 [85,99–96,85] % и 93,9 [90,58–97,28] %

соответственно. Для основных ФД показателей, GIR_{max} и AUC_{GIR 0-8,5} составили 1,067 [95,64–118,94] % и 1,082 [96,5–121,36] % соответственно. Нахождение данных внутри допустимых интервалов 80–125 % свидетельствует о сопоставимости ФК и ФД профилей ИП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании проведенного двойного слепого, рандомизированного, сравнительного, перекрестного исследования ФК и ФД препаратов РинЛиз®, раствор для внутривенного и подкожного введения, 100 МЕ/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и Хумалог®, раствор для внутривенного и подкожного введения, 100 МЕ/мл («Лилли Франс», Франция) с использованием метода ГЭК на здоровых добровольцах тестируемый препарат РинЛиз® и препарат сравнения Хумалог® являются эквивалентными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Campbell R. K., Campbell L. K., White J. R., Insulin lispro: its role in the treatment of diabetes mellitus. *Ann Pharmacother.* 1996; 30(11): 1263–1271.
2. White J. R., Campbell R. K., Hirsch I. Insulin analogues: new agents for improving glycemic control. *Postgrad Med.* 1997; 101(2): 58–70.
3. DeFronzo R. A., Tobin J. D., Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* 1979; 237(3): E214–E223.
4. Heinemann L., Anderson J. H. Measurement of insulin absorption and insulin action. *Diabetes Technol Ther.* 2004; 6(5): 698–718.
5. Heinemann L. Overcoming obstacles: new management options. *Eur J Endocrinol.* 2004; 151: T23–T30.
6. Roden M. Blocking Fatty Acids' Mystery Tour: A Therapy for Metabolic Syndrome? *Cell Metabolism.* 2007: 89–91.
7. Федеральный закон № 61 «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 (ред. от 29.12.2015). Available at: <http://www.pravo.gov.ru>.
8. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues. 26 February 2015, EMEA/CHMP/BMWP/32775/2005_Rev. 1.

9. Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04 Rev. 1).
10. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev. 1).
11. Guideline on the clinical investigation of the pharmacokinetics of therapeutic proteins (EMA/CHMP/ 89249/2004).
12. Guideline on the investigation of bioequivalence (CPMP/EWP/QWP/1401/98).
13. Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins (EMA/CHMP/BMWP/14327/2006).
14. Решение № 89 от 3 ноября 2016 года «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза», глава 15.7 «Доклиническая и клиническая разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный инсулин и аналоги инсулина».
15. Разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции генно-инженерный инсулин человека или аналоги инсулина человека // Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том IV. – М.: Полиграф-плюс. 2014: 172. Глава 3. «Разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции генно-инженерный инсулин человека или аналоги инсулина человека».
16. Rabiee A., Magruder J. T., Grant C., Salas-Carrillo R., Gillette A., DuBois J., Shannon R. P., Andersen D. K., Elahi D. Accuracy and reliability of the Nova StatStrip® glucose meter for real-time blood glucose determinations during glucose clamp studies. *J Diabetes Sci Technol*. 2010; 4(5): 1195–11201.
17. Lindquist K. A., Chow K., West A., Pyle L., Isbell T. S., Cree-Green M., Nadeau K. J. The StatStrip Glucose Monitor Is Suitable for Use During Hyperinsulinemic Euglycemic Clamps in a Pediatric Population. *Diabetes Technol Ther*. 2014; 16(5):298–302.
18. Linnebjerg H., Lam E. C., Seger M.E., Coutant D., Chua L., Chong C. L., Ferreira M. M., Soon D., Zhang X. Comparison of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of LY2963016 Insulin Glargine and EU- and US-Approved Versions of Lantus Insulin Glargine in Healthy Subjects: Three Randomized Euglycemic Clamp Studies. *Diabetes Care*. 2015; 38: 2226–2233.
19. Heise T., Zijlstra E., Nosek L., Heckermann S., Plum-Mörschel L., Forst T. Euglycaemic glucose clamp: what it can and cannot do, and how to do it. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2016; 18(10): 962–972. Doi: 10.1111/dom.12703. Epub 2016 Jul 13.
20. Singh B., Saxena A. Surrogate markers of insulin resistance. *World J Diabetes*. 2010; 1(2): 36–47.
9. Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04 Rev. 1).
10. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev. 1).
11. Guideline on the clinical investigation of the pharmacokinetics of therapeutic proteins (EMA/CHMP/ 89249/2004).
12. Guideline on the investigation of bioequivalence (CPMP/EWP/QWP/1401/98).
13. Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins (EMA/CHMP/BMWP/14327/2006).
14. Decision No. 89 of November 3, 2016 «On approval of the rules for conducting research on biological drugs of the Eurasian Economic Union», chapter 15.7 «Preclinical and clinical development of bio-analogous (biosimilar) drugs containing recombinant insulin and insulin analogues» (in Russ.).
15. Development of bio-analogous (biosimilar) medicines containing human engineering insulin or analogues of human insulin as a pharmaceutical substance // Guidelines for the Expertise of Medicines. Volume IV – M.: Polygraph-plus. 2014: 172. Chapter 3. «Development of bio-analogous (biosimilar) drugs containing, as a pharmaceutical substance, genetically engineered human insulin or analogues of human insulin» (in Russ.).
16. Rabiee A., Magruder J. T., Grant C., Salas-Carrillo R., Gillette A., DuBois J., Shannon R. P., Andersen D. K., Elahi D. Accuracy and reliability of the Nova StatStrip® glucose meter for real-time blood glucose determinations during glucose clamp studies. *J Diabetes Sci Technol*. 2010; 4(5): 1195–11201.
17. Lindquist K. A., Chow K., West A., Pyle L., Isbell T. S., Cree-Green M., Nadeau K. J. The StatStrip Glucose Monitor Is Suitable for Use During Hyperinsulinemic Euglycemic Clamps in a Pediatric Population. *Diabetes Technol Ther*. 2014; 16(5):298–302.
18. Linnebjerg H., Lam E. C., Seger M.E., Coutant D., Chua L., Chong C. L., Ferreira M. M., Soon D., Zhang X. Comparison of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of LY2963016 Insulin Glargine and EU- and US-Approved Versions of Lantus Insulin Glargine in Healthy Subjects: Three Randomized Euglycemic Clamp Studies. *Diabetes Care*. 2015; 38: 2226–2233.
19. Heise T., Zijlstra E., Nosek L., Heckermann S., Plum-Mörschel L., Forst T. Euglycaemic glucose clamp: what it can and cannot do, and how to do it. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2016; 18(10): 962–972. Doi: 10.1111/dom.12703. Epub 2016 Jul 13.
20. Singh B., Saxena A. Surrogate markers of insulin resistance. *World J Diabetes*. 2010; 1(2): 36–47.

REFERENCES

1. Campbell R. K., Campbell L. K., White J. R., Insulin lispro: its role in the treatment of diabetes mellitus. *Ann Pharmacother*. 1996; 30(11): 1263–1271.
2. White J. R., Campbell R. K., Hirsch I. Insulin analogues: new agents for improving glycemic control. *Postgrad Med*. 1997; 101(2): 58–70.
3. DeFronzo R. A., Tobin J. D., Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979; 237(3): E214–E223.
4. Heinemann L., Anderson J. H. Measurement of insulin absorption and insulin action. *Diabetes Technol Ther*. 2004; 6(5): 698–718.
5. Heinemann L. Overcoming obstacles: new management options. *Eur J Endocrinol*. 2004; 151: T23–T30.
6. Roden M. Blocking Fatty Acids' Mystery Tour: A Therapy for Metabolic Syndrome? *Cell Metabolism*. 2007: 89–91.
7. Federal Law No. 61 «On the Circulation of Medicines» dated April 12, 2010 (as amended on December 29, 2015). Available at: <http://www.pravo.gov.ru> (in Russ.).
8. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues// 26 February 2015, EMA/CHMP/BMWP/32775/2005_Rev. 1.



Международная
выставка оборудования,
сырья и технологий
для фармацевтического
производства

Забронируйте
стенд

10-13
НОЯБРЯ
2020

Россия, Москва
МВЦ «Крокус Экспо»

pharmtech-expo.ru



+7 (499) 750-08-28
pharmtech@hyve.group

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-133-139>
УДК 615.03



Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики количественного определения валганцикловира и его метаболита ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ

Т. Н. Комаров^{1*}, И. Е. Шохин¹, О. А. Мискив¹, Д. С. Богданова¹, А. В. Алешина¹,
Ю. В. Медведев^{1,2}, Н. С. Багаева^{1*}

1 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3
2 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

*Контактное лицо: Комаров Тимофей Николаевич. E-mail: t.n.komarov@yandex.ru

Статья получена: 06.04.2020. Статья принята к печати: 15.05.2020

Резюме

Введение. Вирусные инфекции являются серьезной проблемой, возникающей в процессе применения иммунодепрессантов в ходе подготовки к трансплантации органов и в послеоперационном периоде. Цитомегаловирусная (ЦМВ) инфекция – одна из основных причин заболеваний у людей с ослабленным иммунитетом. Она оказывает непосредственное влияние на отторжение трансплантатов. Кроме того, ЦМВ часто является причиной других иммунных осложнений. Для лечения и профилактики данного инфекционного заболевания используют противовирусные лекарственные препараты. Валганцикловир является пролекарством, активным метаболитом которого является ганцикловир. Валганцикловир является препаратом выбора при лечении ЦМВ-инфекций. В настоящее время нет опубликованных методик о совместном определении валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием. В данной работе приведена разработка и валидация методики совместного определения валганцикловира и ганцикловира в плазме крови после пробоподготовки способом осаждения белков.

Цель. Целью исследования является разработка методики количественного определения валганцикловира и его активного метаболита ганцикловира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором (ВЭЖХ-УФ) для проведения фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Количественное определение валганцикловира и его метаболита ганцикловира в плазме крови проводили методом ВЭЖХ-УФ. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, калибровочная кривая (линейность), точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения валганцикловира и его активного метаболита ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. Подтвержденные аналитические диапазоны методики составили 5,0–1000,0 нг/мл для валганцикловира и 100,0–10000,0 нг/мл для ганцикловира в плазме крови. Полученные аналитические диапазоны позволяют применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов, содержащих валганцикловир.

Ключевые слова: валганцикловир, ганцикловир, плазма, ВЭЖХ-УФ, количественное определение, валидация, биоэквивалентность.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, Д. С. Богданова, О. А. Мискив, А. В. Алешина участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку полученных результатов. И. Е. Шохин и Ю. В. Медведев отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в формате научной дискуссии.

Для цитирования: Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мискив О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Медведев Ю. В., Багаева Н. С. Разработка и валидация методики количественного определения валганцикловира и его метаболита ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 133–139.

Development and Validation of Valganciclovir and its Active Metabolite Ganciclovir Determination in Human Plasma by HPLC-UV Method

Timofey N. Komarov^{1*}, Igor E. Shohin¹, Olga A. Miskiv¹, Dana S. Bogdanova¹,
Alexandra V. Aleshina¹, Yuri V. Medvedev^{1,2}, Natalia S. Bagayeva¹

1 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
2 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Timofey N. Komarov. E-mail: t.n.komarov@yandex.ru

Received: 06.04.2020. Accepted: 15.05.2020

Abstract

Introduction. Viral infections are a serious problem that occurs during the use of immunosuppressants in preparation for organ transplantation and in the postoperative period. Cytomegalovirus (CMV) infection is one of the main causes of diseases in people with weakened immune systems. It has a direct impact on one's body and makes it more likely to reject a transplanted organ. Antiviral drugs are used to treat and prevent this infectious

© Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мискив О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Медведев Ю. В., Багаева Н. С., 2020

© Komarov T. N., Shohin I. E., Miskiv O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. V., Medvedev Yu. V., Bagayeva N. S., 2020

disease. Valganciclovir is a prodrug whose active metabolite is ganciclovir. Valganciclovir is the drug of choice in the treatment of CMV infections. Currently, there are no researches on the matter of simultaneous determination of both valganciclovir and ganciclovir in human blood plasma by means of high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection. This research delivers a thorough description of development and validation of a particular method for simultaneous determination of valganciclovir and ganciclovir in the plasma after sample preparation by the method of protein precipitation.

Aim. The aim of this study is to develop method for the quantitative determination of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir in human plasma by HPLC-UV for pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Quantitative determination of valganciclovir in plasma by HPLC-UV. A sample was prepared using protein precipitation.

Results and discussion. This method was validated by next validation parameters: selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, lower limit of quantification, carry-over and stability.

Conclusion. The method of the quantitative determination of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir in human plasma was developed and validated by HPLC-UV. The analytical range of the was 5,0–1000,0 ng/ml for valganciclovir and 100,0–10000,0 ng/ml for ganciclovir in plasma. Method could be applied to determination of valganciclovir and ganciclovir in plasma for PK and BE studies.

Keywords: valganciclovir, ganciclovir, plasma, HPLC-UV, quantitative determination, validation, bioequivalence.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Dana S. Bogdanova, Olga A. Miskiv, Alexandra V. Aleshina have developed and validated an analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results. Igor E. Shohin and Yuri V. Medvedev carried out the organization of work in this direction. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

For citation: Komarov T. N., Shohin I. E., Miskiv O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. V., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S. Development and validation of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir determination in human plasma by HPLC-UV method. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 133–139.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные инфекции являются серьезной проблемой, возникающей в процессе применения иммунодепрессантов в ходе подготовки к трансплантации органов и в послеоперационном периоде [1]. Цитомегаловирусная (ЦМВ) инфекция – одна из основных причин заболеваний у людей с ослабленным иммунитетом [1, 2]. Она оказывает непосредственное влияние на отторжение трансплантатов. Для лечения и профилактики данного инфекционного заболевания используют противовирусные лекарственные препараты [3].

Ганцикловир – противовирусный препарат, синтетический аналог 2'-дезоксигуанозина, который конвертируется в клетках организма человека с помощью фермента фосфотрансферазы в ганцикловир монофосфат, модифицируется далее рядом других фосфорилаций. В итоге в виде ганцикловира трифосфата под действием вирусных ДНК-полимераз встраивается в растущую вирусную ДНК, приводя к нарушению ее удлинения и прекращению репликации возбудителя. Так как фосфорилирование ганцикловира в большей степени зависит от действия вирусных киназ, чем от ферментов клеток человека, оно происходит преимущественно в инфицированных герпес-вирусами клетках [4].

Долгое время ганцикловир являлся препаратом выбора для медикаментозного лечения ЦМВ-инфекций. Внутривенное введение в течение длительного времени являлось золотым стандартом лечения данной инфекции, однако это связано с риском развития других инфекций [5]. Пероральный ганцикловир несмотря на свою безопасность и удобство в применении обладает низкой биодоступностью (около 6 %), поэтому он недостаточно эффективен при ЦМВ-инфекциях [5, 6].

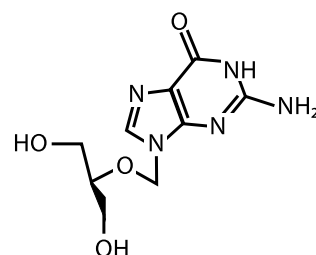


Рисунок 1. Структурная формула ганцикловира

Figure 1. The structural formula of ganciclovir

Валганцикловир – L-валиловый эфир ганцикловира – является пролекарством. Он всасывается через кишечник с помощью пептидных транспортеров PEPT1 и PEPT2 [2]. После всасывания происходит трансформация валганцикловира с ганцикловир под действием кишечных и печеночных эстераз [2, 4]. Биодоступность валганцикловира при пероральном приеме в 10 раз выше по сравнению с ганцикловиром [6], что позволяет использовать более удобную пероральную форму валганцикловира вместо внутривенной формы ганцикловира, сохраняя стабильные концент-

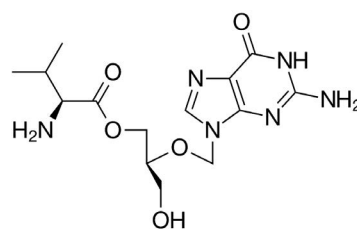


Рисунок 2. Структурная формула валганцикловира

Figure 2. The structural formula of valganciclovir

рации лекарственного средства в крови для длительной поддерживающей терапии [4].

В литературных данных представлено большое количество методик определения валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектором (ВЭЖХ-ФЛД) в сочетании с пробоподготовкой способом осаждения водным раствором трихлоруксусной кислоты (ТСА/ H_2O) [3, 7, 8], высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором (ВЭЖХ-УФ) в сочетании с пробоподготовкой способом осаждения ТСА/ H_2O [1, 5] и способом осаждения ацетонитрилом [9], а также высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemным масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС/МС) в сочетании с пробоподготовкой твердофазной экстракцией (ТФЭ) [6] и способом осаждения метанолом [10].

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения ганцикловира и валганцикловира

Table 1. Bioanalytical methods of quantitative determination of ganciclovir and valganciclovir

Аналитический метод	Пробоподготовка	Аналитический диапазон, нг/мл	Ссылка
<i>Ганцикловир</i>			
ВЭЖХ-УФ	6 % ТСА/ H_2O	63,0–2080,0	[1]
ВЭЖХ-ФЛД	15 % ТСА/ H_2O	100,0–10000,0	[3]
ВЭЖХ-УФ	50 % ТСА/ H_2O	500,0–30000,0	[5]
ВЭЖХ-ФЛД	15 % ТСА/ H_2O	40,0–4000,0	[7]
ВЭЖХ-ФЛД	7 % ТСА/ H_2O	20,0–2000,0	[8]
<i>Валганцикловир</i>			
ВЭЖХ-УФ	Ацетонитрил	10,0–30000,0	[9]
<i>Валганцикловир и ганцикловир</i>			
ВЭЖХ-МС/МС	ТФЭ	5,0–800,0 и 70,0–11200,0 соотв.	[6]
ВЭЖХ-МС/МС	Метанол	4,0–512,0 и 100,0–12800,0 соотв.	[10]

Как показал анализ литературы, в настоящее время нет опубликованных данных по совместному определению валганцикловира и его активного метаболита ганцикловира в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-УФ для исследований фармакокинетики.

В данном исследовании приведена разработка и валидация методики совместного определения валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения 50 % трифторуксусной кислотой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1100, оснащенном градиентным

насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером, флуориметрическим и фотодиодноатричным детекторами. Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения ChemStation, OpenLAB (США).

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (UHPLC grade, Panreac), метанол (supergradient grade, J.T. Baker), кислота уксусная ледяная (х.ч., ООО «НИК Алинда»), аммония ацетат (ос.ч., ООО «Компания Хеликон»), кислота трифторуксусная (х.ч., ООО «ПраймКемикалсГрупп»), вода Milli-Q. Для приготовления исходных рабочих растворов были использованы стандартные образцы валганцикловира (Sun Pharmaceutical Industries Ltd., содержание 100,6 %), ганцикловира гидрохлорида (Sigma-Aldrich, содержание 98,8 %) и ацикловира (USP reference standard).

Исходные стандартные растворы валганцикловира, ганцикловира и внутреннего стандарта (ВС) ацикловира готовили путем растворения навески субстанций в метаноле, рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до необходимых концентраций.

Исходный раствор, стандартный раствор и рабочие растворы хранили в морозильной камере при температуре $-45^{\circ}C$. Образцы интактной плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре $-45^{\circ}C$.

Пробоподготовка

К 600 мкл калибровочного образца (либо к 600 мкл образца плазмы крови добровольцев), помещенным в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта ацикловира, затем прибавляли 300 мкл 50 % водного раствора трифторуксусной кислоты, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 13500 об/мин. Далее супернатант переносили в хроматографические вials и помещали в автосамплер хроматографа.

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ на каждом калибровочном уровне

Table 2. The concentrations of analytes at each calibration level

Уровень	Концентрация аналита, нг/мл		Концентрация внутреннего стандарта, мл
	валганцикловир	ганцикловир	ацикловир
1	5,0	100,0	1666,0
2	10,0	250,0	1666,0
3	50,0	500,0	1666,0
4	100,0	1000,0	1666,0
5	250,0	2500,0	1666,0
6	500,0	5000,0	1666,0
7	1000,0	10000,0	1666,0

Условия хроматографического разделения и детектирования

- ✓ Колонка: YMC-Pack Polyamine II, 250 x 4,6 мм, S – 5 мкм, 12 нм.
- ✓ Температура термостата: 50 °С.
- ✓ Подвижная фаза: элюент А – 50 мМ ацетатный буфер с pH 5,0 (по объёму); элюент В – 0,1 % раствор уксусной кислоты в ацетонитриле (по объёму).
- ✓ Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 1.

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин
0,00	8,00	92,00	2,00
13,00	8,00	92,00	
13,10	12,00	88,00	
20,50	12,00	88,00	
20,60	80,00	20,00	
23,00	80,00	20,00	
23,10	8,00	92,00	
26,00	8,00	92,00	

- ✓ Объем вводимой пробы: 20 мкл.
- ✓ Время регистрации хроматограммы: 0–26 мин.
- ✓ Время удерживания валганцикловира: около 10,9 мин.
- ✓ Время удерживания ацикловира: около 13,6 мин.
- ✓ Время удерживания ганцикловира: около 21,5 мин.
- ✓ Параметры УФ-детектора: длина волны поглощения 254 нм, частота регистрации: 1 Гц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

При разработке методики было отмечено слабое удерживание исследуемых веществ на колонках с октадецилсиликагелевым сорбентом, совпадающее с удерживанием ряда компонентов плазмы, регистрирующихся на хроматограмме как в виде отдельных пиков, так и в виде фронта. В случае применения масс-селективного детектирования достаточное разделение валганцикловира и ганцикловира с компонентами плазмы достигается за счёт высокой селективности детектора. При использовании УФ-детектора возникает необходимость подбора неподвижной фазы, в достаточной мере обеспечивающей удерживание разделяемых компонентов. Поскольку валганцикломир, ганцикломир и внутренний стандарт ацикломир по своей структуре являются азотистыми основаниями, наиболее приемлемых результатов удалось добиться при использовании хроматографической колонки с аминсорбентом YMC-Pack Polyamine II при использовании обратного градиента.

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководства по экспертизе лекарственных средств, том I [11]; а также руководств FDA [12] и EMA [13] по следующим параметрам:

- селективность;
- калибровочная кривая (линейность);
- точность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- нижний предел количественного определения и предел обнаружения;
- перенос пробы;
- стабильность (стабильность исходных и рабочих растворов аналита и ВС; стабильность замороженного и размороженного аналита; краткосрочная стабильность аналита в матрице; долгосрочная стабильность аналита в матрице).

Селективность

Проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови, полученных из разных источников, и образца интактной плазмы крови с прибавлением смешанного рабочего стандартного раствора валганцикловира и ганцикловира до концентрации, соответствующей уровню № 7, а также рабочего раствора внутреннего стандарта (ацикловира). На хроматограммах образцов интактной плазмы крови не наблюдалось пиков со временами удерживания, соответствующих временам удерживания валганцикловира и ганцикловира. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на рисунках 3 и 4.

Калибровочная кривая

Проводили анализ 7 образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего раствора внутреннего стандарта ацикловира и смешанных рабочих стандартных растворов валганцикловира и ганцикловира до концентраций, указанных в таблице 2. По полученным значениям были построены калибровочные графики, приведенные на рисунках 5 и 6, совместно с уравнением калибровочной кривой.

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений приведены в таблице 4.

Точность и прецизионность

Проводили анализ калибровочных образцов плазмы крови, соответствующих уровням №№ 1, 2, 6 и 7, указанных в таблице № 2. Анализ валидационных образцов проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня. Точность и прецизи-

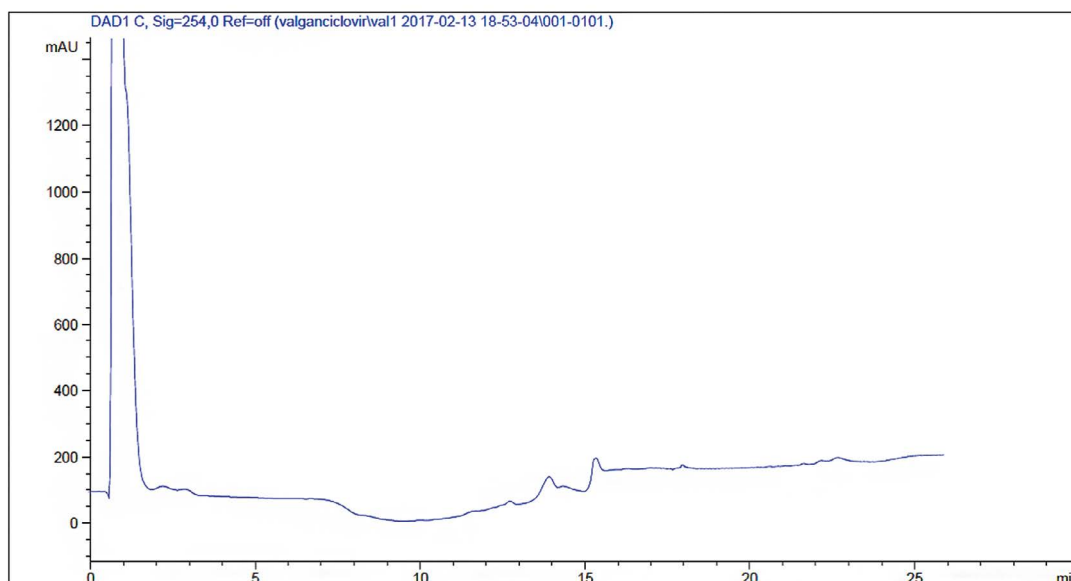


Рисунок 3. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 3. Chromatogram of a blank plasma sample

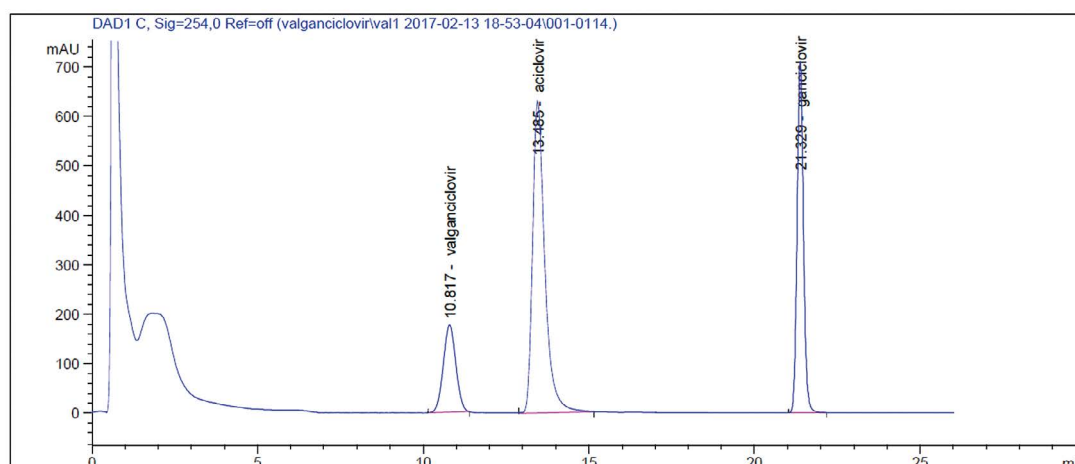


Рисунок 4. Хроматограмма калибровочного образца плазмы крови, уровень № 7 (таблица 2)

Figure 4. Chromatogram of calibration sample, level № 7 (table 2)

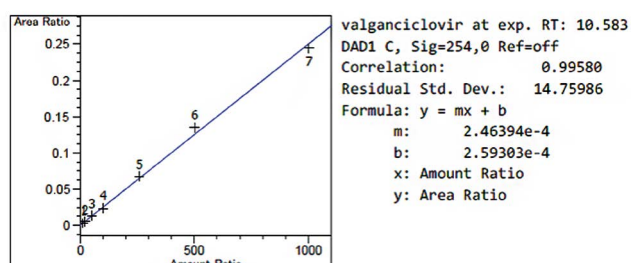


Рисунок 5. Калибровочный график зависимости отношения площади пика валганцикловира к площади пика ацикловира от отношения концентрации валганцикловира к концентрации ацикловира в плазме крови

Figure 5. The calibration curve dependence of the ratio area peak of valganciclovir to the aciclovir on the concentration ratio of valganciclovir to the fciclovir in plasma

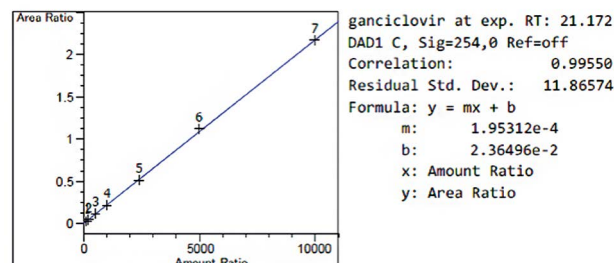


Рисунок 6. Калибровочный график зависимости отношения площади пика ганцикловира к площади пика ацикловира от отношения концентрации ганцикловира к концентрации ацикловира в плазме крови

Figure 6. The calibration curve dependence of the ratio area peak of ganciclovir to the aciclovir on the concentration ratio of ganciclovir to the fciclovir in plasma

онность были оценены внутри цикла (последовательность 1), между двумя циклами (последовательности 1 и 2), между тремя циклами (последовательности 1, 2, 3). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %), приведенные в таблице 5.

Таблица 4. Отклонения концентраций анализируемых веществ в калибровочных образцах от их номинальных значений, калибровочный график № 1

Table 4. Deviations of analyte concentrations in calibration samples from their nominal values, calibration curve № 1

Концентрация валганцикловира номинальная, нг/мл	Концентрация валганцикловира рассчитанная, нг/мл	E, %	Норма не более, %
5,0	4,9	-1,8	20
10,0	11,0	10,1	15
50,0	52,3	4,7	15
100,0	98,3	-1,7	15
250,0	261,1	4,5	15
500,0	480,9	-3,8	15
1000,0	923,4	-7,7	15
Концентрация ганцикловира номинальная, нг/мл	Концентрация ганцикловира рассчитанная, нг/мл	E, %	Норма не более, %
100,0	112,1	12,1	100,0
250,0	241,2	-3,5	250,0
500,0	515,6	3,1	500,0
1000,0	1065,3	6,5	1000,0
2500,0	2601,4	4,1	2500,0
5000,0	4852,4	-3,0	5000,0
10000,0	11023,1	10,2	10000,0

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20 % на уровне НПКО, не более 15 % – для остальных точек).

Нижний предел количественного определения, предел обнаружения

Нижний предел количественного определения (НПКО) методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принимались минимальные концентрации валганцикловира и ганцикловира в плазме крови в диапазонах линейной зависимости, для которых возможно количественное определение валганцикловира и ганцикловира со значениями RSD и E не более 20 %.

Нижний предел количественного определения методики составил 5,0 нг/мл для валганцикловира и 100,0 нг/мл для ганцикловира. Хроматограмма плазмы крови с содержанием валганцикловира и ганцикловира на уровне НПКО приведена на рисунке 7. Отношение сигнал/шум по пикам валганцикловира и ганцикловира на уровне НПКО не превышает 10,4. Предел обнаружения валганцикловира и ганцикловира для данной методики составил около 3,9 нг/мл и 45,3 нг/мл соответственно.

Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность (для приготовленных проб в течение рабочего дня), стабильность при 3-кратной заморозке-разморозке, стабильность для стандартных растворов (при хранении в течение 30 дней при температуре -45 °C), долгосрочная стабильность (при хранении

Таблица 5. Точность и прецизионность методики

Table 5. Accuracy and precision of the method

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение			SD			RSD, %			E, %		
	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)
<i>Валганцикловир</i>												
5,0	5,1	5,1	5,1	0,1	0,2	0,4	1,8	4,3	7,0	1,6	2,5	2,9
10,0	10,8	11,2	10,9	1,2	1,2	0,8	11,3	10,9	7,4	7,8	11,7	8,8
500,0	496,7	506,7	501,0	35,9	32,8	24,8	7,2	6,5	5,0	-0,7	1,3	0,2
1000,0	1013,5	1008,1	1000,9	58,8	72,8	91,0	5,8	7,2	9,1	1,4	0,8	0,1
<i>Ганцикловир</i>												
100,0	101,8	99,8	99,0	8,2	7,7	3,0	8,0	7,7	3,1	1,8	-0,7	-1,0
250,0	246,6	245,6	244,9	8,6	7,0	8,1	3,5	2,8	3,3	-1,4	-1,8	-2,0
5000,0	5073,7	5031,5	5047,2	258,4	222,3	105,6	5,1	4,4	2,1	1,5	0,6	0,9
10000,0	10166,5	10019,9	10057,0	441,5	582,6	314,5	4,3	5,8	3,1	1,7	0,2	0,6

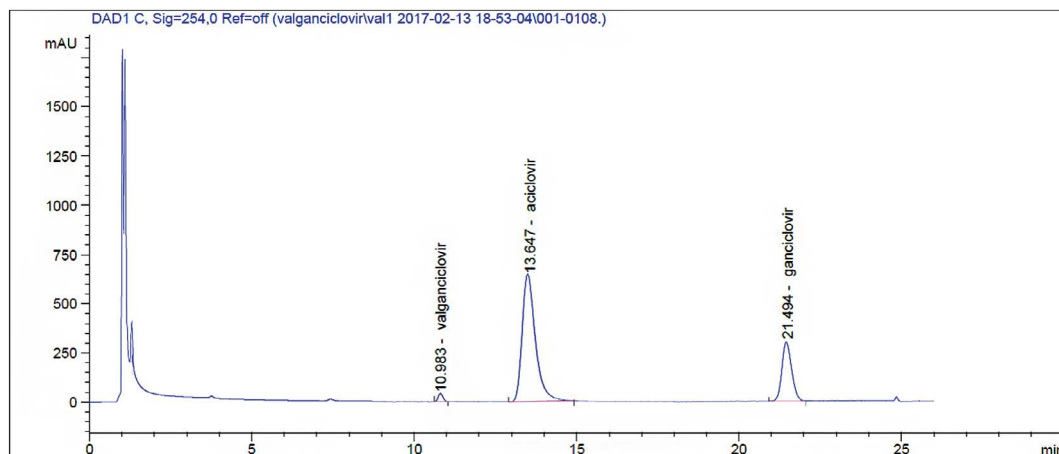


Рисунок 7. Хроматограмма образца с содержанием исследуемых веществ на уровне НПКО

Figure 7. Chromatogram of the sample with the content of the studied substances at the level LLOQ

в течение 30 дней при температуре -45°C) исследуемых веществ на уровнях №№ 2 и 7, указанных в таблице 2.

Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочно-го образца на уровне № 7 и образца интактной плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам валганцикловира, ганцикловира и ацикловира с площадью более чем 20 % от уровня НПКО. Перенос пробы отсутствовал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения валганцикловира и его метаболита ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. Подтвержденные аналитические диапазоны методики составили 5,0–1000,0 нг/мл для валганцикловира и 100,0–10000,0 нг/мл для ганцикловира в плазме крови человека. Полученные аналитические диапазоны позволяют применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов, содержащих валганцикловир.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Teshima D., Otsubo K., Yoshida T., Itoh Y., Oishi R. A simple and simultaneous determination of acyclovir and ganciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*. 2003; 17(8): 500–503. DOI: 10.1002/bmc.258.
2. Czock D., Scholle C., Rasche F. M., Schaarschmidt D., Keller F. Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir in renal impairment. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2002; 72(2): 142–150. DOI: 10.1067/mcp.2002.126306.
3. Perrottet N., Beguin A., Meylan P., Pascual M., Manuel O., Buclin T., Biollaz J., Decosterd L. A. Determination of aciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography–spectrofluorimetric detection and stability studies in blood samples. *Journal of Chromatography B*. 2007; 852(1-2): 420–429. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.01.045.
4. Karpov I. A., Solovey N. V. Valganciclovir as a highly effective drug for the prevention and treatment of herpetic infections. *Medical news*. 2018; 3: 282 (in Russ.).
5. Padullés A., Colom H., Armendariz Y., Cerezo G., Caldes A., Pou L., Torras J., Grinyó J. M., Lloberas N. Determination of ganciclovir in human plasma by ultra performance liquid chromatography–UV detection. *Clinical biochemistry*. 2012; 45(4-5): 309–314. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.12.014.
6. Singh O., Saxena S., Mishra S., Khuroo A., Monif T. Determination of valganciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometric detection. *Clinical biochemistry*. 2011; 44(10-11): 907–915. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.04.003.
7. Chu F., Kiang C. H., Sung M. L., Huang B., Reeve R. L., Tarnowski T. A rapid, sensitive HPLC method for the determination of ganciclovir in human plasma and serum. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1999; 21(3): 657–667. DOI: 10.1016/S0731-7085(99)00161-2.
8. Dao Y. J., Jiao Z., Zhong M. K. Simultaneous determination of aciclovir, ganciclovir, and penciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 2008; 867(2): 270–276. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.04.022.
9. Dogan-Topal B., Ozkan S. A., Uslu B. Simultaneous determination of abacavir, efavirenz and valganciclovir in human serum samples by isocratic HPLC-DAD detection. *Chromatographia*. 2007; 66(1): 25–30.
10. Xu H. R., Li X. N., Chen W. L., Liu G. Y., Chu N. N., Yu C. A sensitive assay for simultaneous determination of plasma concentrations of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir by LC/MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2007; 848(2): 329–334. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.10.053.
11. Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. T. II. M.: Grif and K. 2013: 280 (in Russ.).
12. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
13. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>.

Оценка иммуногенности препаратов пэгфилграстима у пациентов с диагнозом «рак молочной железы»

Ю. В. Медведев^{1,2*}, М. А. Колганова², О. А. Сас², Т. Н. Комаров², Е. Н. Фишер^{1,2},
И. Е. Шохин^{2,3}, Ю. И. Аммура⁴

1 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

2 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

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

4 – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова), 105064, г. Москва, Малый Казенный пер., д. 5А

* Контактное лицо: Медведев Юрий Владимирович. E-mail: y125195@yandex.ru

Статья получена: 09.04.2020. Статья принята к печати: 25.05.2020

Резюме

Введение. Одним из побочных эффектов, развивающихся при противоопухолевой терапии (лекарственной или лучевой), является нейтропения, при которой наблюдается снижение числа нейтрофилов в крови. Нейтропения может привести к повышению риска и тяжести развития бактериальной и грибковой инфекции. Для предотвращения развития нейтропении, а также для лечения применяют гранулоцитарные колониестимулирующие факторы, например филграстим и его конъюгированные формы. Одним из нежелательных явлений характерных для лекарственных веществ пептидной природы является развитие иммуногенности, что обуславливает необходимость изучения иммуногенности у таких ЛС.

Цель. Валидировать методику определения антител к пэгфилграстиму в сыворотке крови, оценить иммуногенность препаратов пэгфилграстима.

Материалы и методы. Для оценки наличия антител к пэгфилграстиму, оценки ингибирования сигнала и установления титра антител использовался набор PEGylated Filgrastim (Neulasta®) ADA ELISA. Для подтверждения применимости данного набора к требуемым задачам методика анализа была подвергнута валидации. Оптическую плотность образцов измеряли с помощью планшетного иммуноферментного анализатора Stat Fax 3200, промывку планшетов осуществляли с помощью автоматического промывателя планшетов.

Результаты и обсуждения. В ходе выполнения работы была проведена валидация методики определения антител к пэгфилграстиму в сыворотке крови. Разработанная методика была применена в рамках простого слепого сравнительного многоцентрового рандомизированного исследования эффективности и безопасности препаратов пэгфилграстима у пациентов с диагнозом «рак молочной железы», получающих миелосупрессивную терапию. Образцы, полученные от клинического центра, были подвергнуты скринингу на наличие антител к пэгфилграстиму, были выявлены пробы, содержащие антитела, проведен подтверждающий анализ, рассчитан процент ингибирования и установлен титр антител.

Заключение. Методика определения антител была подвергнута валидации, после чего применена для оценки иммуногенности препаратов пэгфилграстима.

Ключевые слова: пэгфилграстим, иммуногенность, ИФА, противолечательные антитела.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Ю. В. Медведев, М. А. Колганова, О. А. Сас и Ю. И. Аммура валидировали методику определения антител к пэгфилграстиму в сыворотке крови, проводили исследования и измерения. Т. Н. Комаров и Е. Н. Фишер провели обработку данных. И. Е. Шохин, М. А. Колганова и Ю. И. Аммура проводили интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Медведев Ю. В., Колганова М. А., Сас О. А., Комаров Т. Н., Фишер Е. Н., Шохин И. Е., Аммура Ю. И. Оценка иммуногенности препаратов пэгфилграстима у пациентов с диагнозом «рак молочной железы». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 140–144.

Immunogenicity Assessment of Pegfilgrastim in Patients with Breast Cancer

Yuri V. Medvedev^{1,2*}, Maria A. Kolganova², Olga A. Sas², Timofey N. Komarov²,
Elizaveta N. Fisher^{1,2}, Igor E. Shohin^{2,3}, Yulia I. Ammour⁴

1 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

3 – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

4 – Federal State Budgetary Scientific Institution «I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 5A, Maly Kazenny lane, Moscow, 105064, Russia

*Corresponding author: Yuri V. Medvedev. E-mail: y125195@yandex.ru

Received: 09.04.2020. Accepted: 25.05.2020

Abstract

Introduction. Neutropenia, which is an abnormally low concentration of neutrophils in the blood, is one of the common side effects in patients receiving radio- or chemotherapy. Neutropenia usually leads to higher risks of severe bacterial and fungal infections. Such medicines as colony-stimulating factor filgrastim (and its conjugates) are used to prevent and treat neutropenia in oncology patients. Immunogenicity is a potential concern for any biological product, thus, its assessment is one of the most critical necessities during the development and registration of such products.

Aim. The main aim of this study was to validate the ELISA method for anti-pegfilgrastim antibodies detection in human serum samples and to apply the validated method to pegfilgrastim drugs immunogenicity assessment.

Materials and methods. To assess pegfilgrastim immunogenicity, the commercial ELISA kit «PEGylated Filgrastim (Neulasta®) ADA ELISA» was used for screening, confirmatory and titer assay. Moreover, to confirm the chosen commercial kit suits the study aims it was revalidated. The absorbance values were obtained using plate immunoassay analyzer Stat Fax 3200, plate washing was performed using an automatic two-channel plate washer.

© Медведев Ю. В., Колганова М. А., Сас О. А., Комаров Т. Н., Фишер Е. Н., Шохин И. Е., Аммура Ю. И., 2020

© Medvedev Yu. V., Kolganova M. A., Sas O. A., Komarov T. N., Fisher E. N., Shohin I. E., Ammour Yu. I., 2020

Results and discussion. The ELISA method for anti-pegfilgrastim antibodies determination in human serum samples was validated and applied to the analytical part of the comparative, multicenter, blind, randomized study of pegfilgrastim efficacy and safety in patients with breast cancer, receiving myelosuppressive chemotherapy. Human serum samples were first screened for anti-drug antibodies, then «screening positive» samples were analyzed in confirmatory assay with % inhibition calculation for each sample. The «confirmed positive» samples were further characterized in titer assay.

Conclusions. The ELISA method for anti-pegfilgrastim antibodies determination in human serum samples was successfully validated and applied for pegfilgrastim drugs immunogenicity assessment.

Keywords: pegfilgrastim, immunogenicity, ELISA, anti-drug antibodies (ADA).

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Yuri V. Medvedev, Maria A. Kolganova, Olga A. Sas and Yulia I. Ammur validated the method for determining antibodies to pegfilgrastim in blood serum, conducted research and measurements. Timofey N. Komarov and Elizaveta N. Fisher conducted data processing. Igor E. Shokhin, Maria A. Kolganova and Yulia I. Ammur interpreted the results. All authors participated in the discussion of the results and the writing of the text of the article.

For citation: Medvedev Yu. V., Kolganova M. A., Sas O. A., Komarov T. N., Fisher E. N., Shokhin I. E., Ammour Yu. I. Immunogenicity assessment of Pegfilgrastim in patients with breast cancer. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 140–144.

ВВЕДЕНИЕ

Филграстим – негликолизированный белок, состоящий из 175 аминокислот, который вырабатывается штаммом *Escherichia coli*, в геном которой введен ген колониестимулирующего фактора человека. Является гемопоэтическим фактором роста, регулирует образование функционально активных нейтрофилов в костном мозге и стимулирует их выход в кровь. Филграстим применяют при нейтропении, фебрильной нейтропении, для стимуляции периферических стволовых клеток крови, при тяжелой врожденной нейтропении у детей и взрослых с тяжелыми инфекциями в анамнезе, при стойкой нейтропении у пациентов с ВИЧ инфекцией. [1–5].

Пэгфилграстим – ковалентный конъюгат филграстима с полиэтиленгликолем с молекулярной массой 20 кДа. В результате конъюгации филграстима и полиэтиленгликоля снижается почечный клиренс препарата, что выражается в пролонгировании его действия. Пэгфилграстим применяют при нейтропениях, возникающих при цитотоксической химиотерапии [6].

Помимо пэгфилграстима применяют и другие конъюгированные формы филграстима – липэгфилграстим и эмпэгфилграстим со схожими показаниями к применению.

Липэгфилграстим – ковалентный конъюгат филграстима, связанного с молекулой метоксиполиэтиленгликоля через олигопептид, состоящий из глицина, N-ацетилнейраминовой кислоты и N-ацетилгалактозамина [7].

Эмпэгфилграстим – ковалентный конъюгат филграстима с полиэтиленгликолем с молекулярной массой 30 кДа [8].

Период полувыведения ($T_{1/2}$) филграстима – около 3,5 часов; $T_{1/2}$ пэгфилграстима – 15–80 часов [9]; $T_{1/2}$ липэгфилграстима – 32–49 часов [7]; $T_{1/2}$ эмпэгфилграстима – 78 часов [8].

Одним из наиболее вероятных нежелательных явлений характерных для лекарственных веществ

пептидной природы является развитие иммуногенности, как результат ответа иммунной системы на попадание чужеродного белка в организм человека. При этом последствия иммунного ответа могут быть как несущественными, так и весьма тяжелыми, поэтому на этапе регистрации таких ЛС важно произвести оценку иммуногенности. Одним из наиболее распространенных методов определения антител к ЛВ является иммуноферментный анализ [10], в частности, в настоящее время опубликован ряд работ по определению антител к филграстиму и его конъюгированным формам в сыворотке крови [11–13] с применением ИФА теста.

Цель

Проведение валидации методики определения антител к пэгфилграстиму в сыворотке крови и оценка иммуногенности препаратов пэгфилграстима.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки безопасности исследуемых препаратов проводили скрининг проб сыворотки на содержание в них специфических антител к пэгфилграстиму. Нами был выбран набор PEGylated Filgrastim (Neulasta®) ADA ELISA, производства Somru BioScience, который представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ «сэндвич»-типа для определения концентрации антител к пэгфилграстиму. Оптическую плотность образцов измеряли с помощью планшетного иммуноферментного анализатора Stat Fax 3200, Awareness Technology, Inc. (США); промывку планшетов осуществляли с помощью промывателя планшетов автоматического двухканального ПП2-428, Иммедтех (Россия); термостатирование и перемешивание проводили, используя термошейкер для планшетов PST-60HL, Biosan (EC). Воду очищенную типа 1 получали с помощью установки «АКВАЛАБ» УВОИ-«МФ»-1812-1 AL-1 plus (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ИФА анализ проводили согласно инструкции к набору, общее время анализа – около 3 часов с учетом этапов внесения проб и отмывки. По результатам скрининга проводили подтверждающий анализ антител к пэгфилграстиму по идентичной методике. Для проб, которые по результатам скрининга были признаны «потенциально положительными» была проведена оценка ингибирования сигнала с помощью ЛВ, а также был установлен титр антител, который определяли, подвергая анализу разбавленные образцы (в 2, 4, 8 и 16 раз).

Валидация методики

Для оценки наличия антител к пэгфилграстиму, оценки ингибирования сигнала и установления титра антител использовался набор PEGylated Filgrastim (Neulasta®) ADA ELISA. Для подтверждения применимости данного набора к требуемым задачам методика анализа, приведенная в инструкции, была подвергнута валидации по следующим параметрам: специфичность, прецизионность, предел определения.

Для определения специфичности использовались образцы Negative Control, входящие в состав набора и образцы сыворотки, достоверно не содержащие антител к пэгфилграстиму. Было показано, что оптическая плотность образца, не содержащего антител к пэгфилграстиму, не превышала оптическую плотность образца, содержащего антитела к пэгфилграстиму на уровне предела обнаружения.

Для оценки прецизионности проводили анализ образцов High Positive Control и Low Positive Control. Анализ проводили для 3 последовательностей. Исследование проводили в течение 1-ой последовательности (внутри цикла), 2-ой и 3-ей последовательности (между циклов). Значения относительного стандартного отклонения (RSD, %), приведенные в таблице 1.

Таблица 1. Прецизионность методики

Table 1. Precision methods

Образец	О.П., среднее значение (n = 5)	RSD, % (n = 5)	О.П., среднее значение (n = 10)	RSD, % (n = 10)	О.П., среднее значение (n = 15)	RSD, % (n = 15)
Low Positive Control	0,73	10,2	0,73	11,2	0,74	10,0
High Positive Control	3,17	1,1	3,17	1,0	3,17	0,9

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) соответствуют нормам [14] (не более 20 % для нижнего диапазона линейности, не более 15 % – для остальных точек).

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных по прецизионности. Предел определения методики составил 23 нг/мл (концентрация антител к пэгфилграстиму в образце Low Positive Control согласно инструкции к набору).

По результатам валидации методика была признана пригодной для оценки наличия антител к пэгфилграстиму, оценки ингибирования и установления титра антител.

Скрининг образцов

Процедуре скрининга были подвергнуты образцы сыворотки крови пациентов женского пола с диагнозом «рак молочной железы», получающих миелосупрессивную терапию. Введение препаратов, в том числе проведение курсов химиотерапии, регистрация нежелательных явлений, отбор образцов для анализа и другие медицинские процедуры осуществлялись в соответствующем клиническом центре согласно протоколу исследования. Режим дозирования лекарственных препаратов пэгфилграстима – 6 мг, подкожно, через 24 часа после введения цитотоксических химиотерапевтических средств, число курсов химиотерапии – 4. Отбор проб для оценки иммуногенности проводился в 1 визит, 5 визит (13 неделя после визита 1), 6 визит (26 неделя после визита 1).

В общей сложности процедуре скрининга было подвергнуто 60 образцов. Анализ проводился в двух повторях. Процедура анализа включала следующие этапы:

- подготовка реагентов, входящих в состав ИФА-набора, разморозка проб;
- разбавление образцов в 100 раз и внесение их в лунки планшета;
- инкубация в течение 60 минут при температуре 25 °С;
- трехкратная промывка планшета;
- внесение детектирующего агента;
- инкубация в течение 60 минут при температуре 25 °С;
- трехкратная промывка планшета;
- внесение субстрата (тетраметилбензидин);
- инкубация в течение 15 минут при температуре 25 °С;
- внесение стоп-реагента;
- измерение оптической плотности при длине волны 450 нм и референсной длине волны 630 нм.

Для определения «потенциально положительных» образцов сыворотки крови на этапе скрининга было выбрано значение предела исключения мето-

дики (screening cut-point). Предел исключения определяли согласно инструкции к набору по следующей формуле:

$$\text{Cut point} = \text{Ср. знач. ОП} + 2 \text{ S.D.},$$

где Cut point – предел исключения для этапа скрининга; Ср. знач. ОП – среднее значение оптической плотности 6 образцов интактной сыворотки крови; S.D. – стандартное отклонение для значений оптической плотности 6 образцов интактной сыворотки крови.

По результатам анализа значение предела исключения для этапа скрининга составило 0,373 о.е. Соответственно, «потенциально положительными» были признаны исследуемые образцы, оптическая плотность которых превышала значение предела исключения. На этапе скрининга 2 пробы были признаны «сомнительными» (оптическая плотность находилась в диапазоне $\pm 10\%$ от cut point) и 3 пробы были признаны «потенциально положительными».

Подтверждающий анализ

Для проб, признанных «сомнительными» или «потенциально положительными», был проведен подтверждающий анализ. Процедура подтверждающего анализа в целом повторяла этапы проведения ИФА при скрининге, однако в исследуемые и контрольные образцы добавляли пэгфилграстим. Анализ проводился в двух повторях.

В результате проведения подтверждающего анализа было выявлено, что во всех исследованных образцах происходит снижение оптической плотности (ингибирование сигнала) при внесении в образец лекарственного средства пэгфилграстим, что говорит о наличии видоспецифических антител в данных образцах.

Для каждого образца был рассчитан процент ингибирования в соответствии с формулой:

$$X = 100 \times [1 - (A/B)],$$

где А – оптическая плотность образца с добавлением ЛС; В – оптическая плотность образца без добавления ЛС; О.П. – оптическая плотность.

Процент ингибирования составил 90–94 %.

Определение титра антител

Для установления титра антител проводили анализ контрольных образцов, «положительных» исследуемых образцов (с добавлением пэгфилграстима и без него), а также исследуемых образцов, разбавленных в 2, 4, 8 и 16 раз с помощью буфера для разбавления проб (assay buffer входит в состав набора). В остальном схема анализа повторяла этапы проведения ИФА при скрининге. Разведения образцов было выбрано таким образом, чтобы оптическая плотность как минимум одного из разведений была ниже

значения предела исключения. Титр антител в исследуемых образцах – максимальное разведение, при котором значение ОП исследуемого образца превышает значение предела исключения. Титр антител к пэгфилграстиму во всех исследуемых образцах составил 1:4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы была проведена валидация методики определения антител к пэгфилграстиму в сыворотке крови по следующим валидационным параметрам: селективность, прецизионность, предел определения. Образцы, полученные от клинического центра, были подвергнуты скринингу на наличие антител к пэгфилграстиму (общее количество проб – 60), 2 пробы были признаны «сомнительными» и 3 пробы были признаны потенциально «положительными». В ходе подтверждающего анализа все исследованные пробы были признаны положительными. Для них был рассчитан процент ингибирования, который составил 90–94 %, а также установлен титр антител к пэгфилграстиму, равный 1:4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нейпоген®. Available at: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_2263.htm.
2. Динова Е. А., Зимин С. Б., Щербина А. Ю. Применение препарата Грасальва в лечении первичной и вторичной иммунной нейтропении у детей. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2008; 7(4): 38–40.
3. Грицаев С. В., Кузьяева А. А., Запиреева И. М. и др. Опыт применения пэгфилграстима в посттрансплантационном периоде у больных множественной миеломой при трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2016; 58 (4): 37–44.
4. Алексеева Е. И., Валиева С. И., Бзарова Т. М. и др. Эффективность и безопасность отечественного рекомбинантного человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора при нейтропениях, развивающихся на фоне анти- в клеточной и иммуносупрессивной терапии у больных ювенильным ревматоидным артритом. *Вопросы современной педиатрии*. 2010; 9(4): 94–100.
5. Финогенова Н. А. Характеристика гранулоцитарного колониестимулирующего фактора: показания к применению. *Современная онкология*. 2007; 9(4): 18–20.
6. Неуластим®. Available at: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_35598.htm.
7. Липэпфилграстим. Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_6542.htm.
8. Эмпэпфилграстим. Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_6712.htm.
9. Pegfilgrastim. Available at: <https://www.drugs.com/monograph/pegfilgrastim.html>.
10. Kramer D. Binding Antibodies: Assay Methodologies, Screening Confirmation, Characterization of Anti-Drug-Antibodies. *EIP Open Symposium Munchen 2013*. Germany. 2013.
11. A Comparison of Proposed Biosimilar LA-EP2006 and Reference Pegfilgrastim for the Prevention of Neutropenia in Patients With Early-Stage Breast Cancer Receiving Myelosuppressive Adjuvant or Neoadjuvant Chemotherapy: Pegfilgrastim Randomized Oncology (Supportive Care) Trial to Evaluate Comparative Treatment (PROTECT-2), a Phase III, Randomized, Double-Blind

- Trial. *Oncologist*. 2016; 21(7): 789–794. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0011>.
12. Advani S. H., Achrekar S., Thomas D., Krishnanrutty B. Granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) in chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. 2010; 31: 79–82. DOI: 10.4103/0971-5851.73590.
13. Waller C., Ranganna G. M., Pennella E. et al. Comparison of Immunogenicity between the Proposed Pegfilgrastim Biosimilar MYL-1401H and Reference Pegfilgrastim. *Blood*. 2017; 130: 3568. DOI: https://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.3568.3568/
14. А. Н. Миронов. Руководство по экспертизе лекарственных средств. – М.: Гриф и К. Том I. 2013: 328.
5. Finogenova N. A. Characteristics of granulocytic colony stimulating factor: indications for use. *Journal of Modern Oncology (Sovremennaya onkologiya)*. 2007; 9(4): 18–20 (in Russ.).
6. Neulastim®. Available at: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_35598.htm (in Russ.).
7. Lipegfilgrastim. Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_6542.htm (in Russ.).
8. Empegfilgrastimum. Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_6712.htm (in Russ.).
9. Pegfilgrastim. Available at: <https://www.drugs.com/monograph/pegfilgrastim.html>.
10. Kramer D. Binding Antibodies: Assay Methodologies, Screening Confirmation, Characterization of Anti-Drug-Antibodies. *EIP Open Symposium Munchen 2013*. Germany. 2013.
11. A Comparison of Proposed Biosimilar LA-EP2006 and Reference Pegfilgrastim for the Prevention of Neutropenia in Patients With Early-Stage Breast Cancer Receiving Myelosuppressive Adjuvant or Neoadjuvant Chemotherapy: Pegfilgrastim Randomized Oncology (Supportive Care) Trial to Evaluate Comparative Treatment (PROTECT-2), a Phase III, Randomized, Double-Blind Trial. *Oncologist*. 2016; 21(7): 789–794. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0011>.
12. Advani S. H., Achrekar S., Thomas D., Krishnanrutty B. Granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) in chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. 2010; 31: 79–82. DOI: 10.4103/0971-5851.73590.
13. Waller C., Ranganna G. M., Pennella E. et al. Comparison of Immunogenicity between the Proposed Pegfilgrastim Biosimilar MYL-1401H and Reference Pegfilgrastim. *Blood*. 2017; 130: 3568. DOI: https://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.3568.3568.
14. Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. V. I. – М.: Грив и К. 2013: 328 (in Russ.).

REFERENCES

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-145-150>
УДК 615:12



Обзорная статья/Review article

Методы оценки эквивалентности профилей растворения: современный взгляд (обзор)

И. Е. Шохин^{1,2}, Н. С. Багаева^{1*}, Е. А. Малашенко³, В. Н. Кузина³

1 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

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

3 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

*Контактное лицо: Багаева Наталья Сергеевна. E-mail: natashka.bagaeva@inbox.ru

Статья получена: 09.04.2020. Статья принята к печати: 27.05.2020

Резюме

Введение. Один из основных этапов СТР – оценка эквивалентности профилей растворения исследуемого препарата и препарата сравнения.

Текст. Согласно действующим нормативным документам, количественным параметром оценки эквивалентностей профилей высвобождения лекарственных препаратов является фактор сходимости (f_2). Однако такой подход не позволяет учесть такую важную информацию о поведении ЛП в среде растворения, как: форма профилей растворения, случаи неполного высвобождения лекарственного вещества, временную корреляцию, наличие значений «выбросов», что может привести к ложноположительным результатам. Особое внимание стоит уделить растворению препаратов с большой вариабельностью. Помимо расчета фактора сходимости f_2 для количественной оценки эквивалентности профилей растворения можно использовать модельно-зависимые и модельно-независимые методы, которые лишены перечисленных недостатков и которые будут более статистически корректны, а их использование возможно обосновать: фактор различия f_1 , функция распределения Вейбулла, сравнение степеней высвобождения в разных временных точках по t-критерию Стьюдента. Недостатком данных моделей является их эмпирический характер, который ставит под сомнение возможность применения таких методов. В настоящее время широкое обсуждение получил многомерный анализ, который можно использовать для сравнения сходства профилей растворения с предположением, что данные имеют нормальное распределение. Наиболее распространенными методами для проверки схожести профилей растворения для высоко вариабельных лекарственных препаратов являются: использование расстояния Махаланобиса и метод bootstrap для f_2 . Например, ЕМА подробно разъясняет пригодность расстояния Махаланобиса для оценки сходства профилей растворения лекарственных препаратов, а также подчеркивает важность доверительных интервалов для количественной оценки неопределенности вокруг выбранного показателя. Методология bootstrap не дает ясного представления о возможности ее применения при работе с факторами сходимости профилей f_2 , получающихся в результате СТР лекарственных препаратов с неполным высвобождением, в частности, при исследованиях в биореlevantных средах. Функция «T2EQ», основанная на расстоянии Махаланобиса для высоко вариабельных лекарственных препаратов (по Хоффелдеру), на практике дает неоднозначные результаты.

Заключение. Тема количественной статистической оценки эквивалентности профилей растворения требует дальнейшего обсуждения, поскольку по ряду объективных признаков фактор сходимости морально устарел и, в ряде случаев, не может быть адекватно применен. Использование современных статистических инструментов в данный момент не имеет нормативного подтверждения регулирующих органов. В существующих научных публикациях описаны некоторые статистические методы, которые сравнивались по своей конструкции и эффективности. Необходимо разработать четкий план (decision tree) проведения выбора статистического метода процедуры оценки эквивалентности профилей растворения.

Ключевые слова: профиль растворения, фактор сходимости, расстояние Махаланобиса, bootstrap, T²-тест эквивалентности.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы участвовали в сборе информации, её анализе, обсуждении и написании текста статьи.

Для цитирования: Шохин И. Е., Багаева Н. С., Малашенко Е. А., Кузина В. Н. Методы оценки эквивалентности профилей растворения: современный взгляд. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 145–150.

Method of Estimating the Equivalence of Dissolution Profiles: a Modern View (Review)

Igor E. Shohin^{1,2}, Natalia S. Bagaeva^{1*}, Evgeniya A. Malashenko³, Vera N. Kuzina³

1 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

2 – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

3 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Natalia S. Bagaeva. E-mail: natashka.bagaeva@inbox.ru

Received: 09.04.2020. Accepted: 27.05.2020

Abstract

Introduction. One of the purposes of dissolution profile comparison is to establish the equivalence of dissolution profiles of the studied drug and the comparison drug.

Text. According to the current regulatory documents, the main tool for quantitative confirmation of equivalence of drug release profiles is the calculation of the similarity factor (f_2). However, it does not consider the form of dissolution profiles, incomplete release of the drug substance, time correlation, and is not susceptible to the «outliers», which leads to false positive results. Special attention should be paid to the dissolution of drugs with high variability, which is not eliminated by either increasing the sample or changing the sampling scheme. If f_2 is not used, it is necessary to use model-dependent and model-independent methods that are statistically correct, and their use is sufficiently justified (difference factor f_1 , Weibull distribution function, comparison of release degrees at different time points (according to the student's t-criterion)). However, these models have

an empirical nature that calls into question the application of such methods. Multivariate analysis is widely discussed in the literature and can be used to compare the similarity of dissolution with the assumption that the data has a normal distribution. The most common methods for checking similarity of dissolution profiles for highly variable drugs are the Mahalanobis distance test and the bootstrap for f_2 . There is a document of EMA about suitability of the Mahalanobis distance as a tool to assess the comparability of drug dissolution profiles and to a larger extent to emphasise the importance of confidence intervals to quantify the uncertainty around the point estimate of the chosen metric. The bootstrap methodology for f_2 does not provide a clear understanding of the application to dissolution profile comparison for incomplete-release drugs, particularly in biorelevant environments. The «T2EQ» function, based on the Mahalanobis distance for highly variable drugs (Hoffelder), gives undefined results in practice.

Conclusion. The topic of equivalence of dissolution profiles requires discussion, since it is shown that the convergence factor is outdated and cannot be adequately applied. The use of modern methods does not have a clear regulatory confirmation by the regulatory authority. In the published scientific literature, several statistical methods have been explored and compared for their design and performance. It is necessary to develop a clear plan (decision tree) for conducting the procedure for equivalence of dissolution profiles, employing a range of statistical methods.

Keywords: dissolution profiles, similarity factor, Mahalanobis distance, bootstrap, T^2 test for equivalence.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors participated in the collection of information, its analysis, discussion and writing the text of the article.

For citation: Shohin I. E., Bagaeva N. S., Malashenko E. A., Kuzina V. N. Method of estimating the equivalence of dissolution profiles: a modern view. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 145–150.

ВВЕДЕНИЕ

Сравнительный тест кинетики растворения (СТКР) – испытание, включающее в себя получение и сравнение профилей растворения исследуемого лекарственного препарата и референтного лекарственного препарата, как правило, в 3 средах – буферных растворах с pH 1,2; 4,5 и 6,8 [1]. Один из этапов СТКР – оценка эквивалентности профилей растворения исследуемого препарата и препарата сравнения.

ОБЗОР РУКОВОДСТВ

Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» [1], Руководством по экспертизе лекарственных средств [2], а также Руководством ЕМА [3] устанавливается, что основным инструментом количественной оценки эквивалентности профилей высвобождения исследуемого препарата и препарата сравнения является расчет фактора сходимости (f_2):

$$f_2 = 50 \times \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} [(R(t) - \bar{T}(t))^2]}{n}}} \right],$$

где n – число временных точек; $R(t)$, % – среднее количество растворившегося на момент t (после начала исследования) лекарственного вещества из препарата сравнения; $T(t)$, % – среднее количество растворившегося на момент t (после начала исследования) лекарственного вещества из исследуемого препарата.

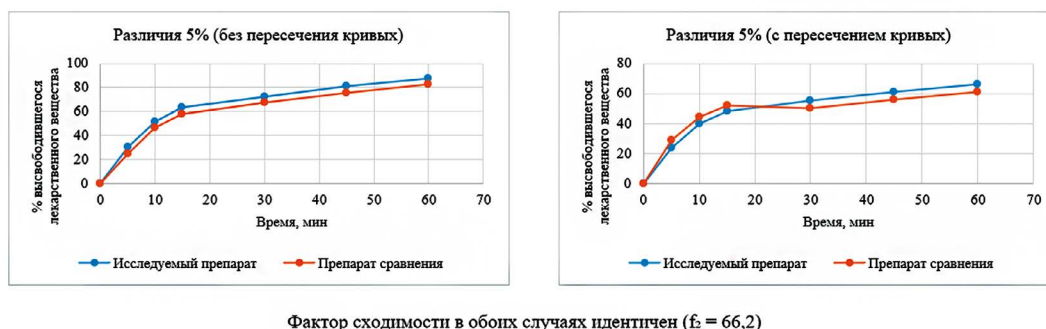
Эквивалентными профили признаются в случае, когда величина f_2 принимает значение в диапазоне 50–100.

Расчет фактора сходимости f_2 возможен в случае, если соблюдаются следующие условия:

- минимальное количество временных точек – 3 (не считая нулевой точки);
- для сравниваемых лекарственных препаратов выбираются одинаковые временные точки;
- для каждой временной точки для каждого из препаратов процент высвобождения устанавливался путем расчета среднего значения минимум из 12 повторностей;
- для каждого из составов допускается не более одного случая превышения среднего значения степени высвобождения 85 %;
- значение величины относительного стандартного отклонения (RSD) количества высвободившегося лекарственного вещества в первой временной точке не превышает 20 %, для остальных временных точек – не превышает 10 % [1].

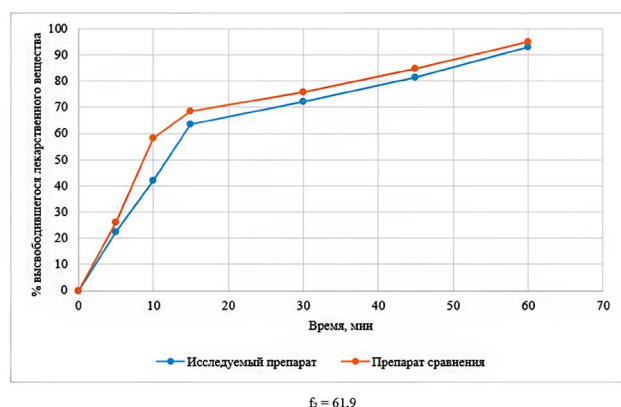
Если по результатам исследования за 15 минут в раствор переходит более 85 % активного фармацевтического ингредиента, результаты признаются эквивалентными без дальнейшей математической оценки.

Однако рассчитанный таким образом фактор сходимости не способен сравнить форму профилей растворения, учесть факт неполного высвобождения, что нередко наблюдается в биорелевантных средах (так, пара профилей с высвобождением АФИ к последней точке на уровне 1 % и 9 % соответственно, будут признаны эквивалентными по фактору сходимости) временную корреляцию, а также не восприимчив к значениям «выбросам» (границы приемлемости сходства более 10 %), что приводит к ложноположительным результатам (рисунки 1–2). Особое внимание



Фактор сходности в обоих случаях идентичен ($f_2 = 66,2$)

Рисунок 1. Влияние формы профилей на фактор сходности
Figure 1. Effect of the shape of the profiles on the similarity factor



$f_2 = 61,9$

Рисунок 2. Влияние значений-«выбросов» на фактор сходности (в точке 10 минут разница значения высвободившегося ЛВ (%) исследуемого препарата и препарата сравнения составляет 16,5 %)

Figure 2. Effect «outlier» on the similarity factor (at the point of 10 minutes, the difference in the value of the released drug (%) of the study drug and the comparison drug is 16.5 %)

стоит уделить растворению препаратов с большой вариабельностью, которая не устраняется ни увеличением выборки, ни изменением схемы отбора проб. Применение f_2 для оценки эквивалентности профилей вышеперечисленных случаев не приемлемо.

В случае, если для обработки результатов СТР невозможно применить расчет фактора сходности f_2 в виду невыполнения приведенных выше критериев, профили растворения можно сравнивать, используя модельно-зависимые и модельно-независимые методы, которые будут статистически корректны, а их использование достаточно обосновано. Пределы приемлемости критерия эквивалентности профилей должны быть определены, обоснованы и не должны превышать 10 %. Кроме того, вариабельность растворения (RSD) между данными исследуемого и референтного лекарственного препарата также должна быть сопоставимой, однако более низкая вариабельность для исследуемого лекарственного препарата является приемлемой [1]. Действующие нормативные документы [1–4] относят к таким методам: фактор

различия f_1 , функция распределения Вейбулла, сравнение степеней высвобождения в разных временных точках (например, по t-критерию Стьюдента).

ПУТИ РЕШЕНИЯ

Применение формулы Вейбулла

Общее эмпирическое уравнение, адаптированное к процессу растворения. Формула Вейбулла выражает количество высвободившегося активного фармацевтического ингредиента (m) в раствор за время (t):

$$m = 1 - e^{\left[\frac{-(t-T_i)^b}{a} \right]},$$

где a – коэффициент масштаба; T – время задержки до начала процесса растворения (чаще всего 0); b – параметр, определяющий форму распределения ($b = 1$ – экспонента, $b < 1$ – параболическая кривая с более высоким начальным наклоном, стремящаяся к экспоненциальной кривой, $b > 1$ – сигмовидная, S-образная кривая с восходящей кривизной) [5].

Данное выражение можно преобразовать следующим образом:

$$\log[-\ln(1-m)] = b \cdot \log(t - T_i) - \log a.$$

Из этого уравнения можно получить линейное соотношение для логарифмического графика зависимости $-\ln(1-m)$ от времени t . Параметр формы распределения (b) можно получить из наклона линии. Параметр масштаба (a) оценивается по значению ординаты ($1/a$) в момент времени $t = 1$. Параметр a можно заменить на более информативное понятие «время растворения» T_d , которое определяется как $a = (Td)^b$ и графически означает как время значение, соответствующее ординате $-\ln(1-m) = 1$, что эквивалентно $m = 0,632$. Следовательно, T_d представляет собой временной интервал, необходимый для растворения или высвобождения 63,2 % АФИ из лекарственной формы. Для лекарственных препаратов, следуя этой модели, логарифм количества раство-

ренного АФИ в зависимости от логарифма временно-го графика носит линейный характер [5].

Однако модель Вейбулла соответствует эмпирической модели, она имеет некоторые недостатки:

- ✓ Данная модель может носить описательный характер, но адекватность характеристик кинетических свойств лекарственного средства при растворении ставится под сомнение, поскольку в модели нет ни единого параметра, характеризующего скорость растворения лекарственного вещества.
- ✓ Параметры модели определяются «подгоном» под экспериментальные данные.
- ✓ Модель имеет ограниченное применение для создания корреляции исследований *in vivo/in vitro*.

Современные методы

В литературных данных широко обсуждается многомерный анализ (multivariate analysis). Его можно использовать для сравнения сходства растворения с предположением, что данные имеют нормальное распределение. Наиболее распространенными методами проверки схожести профилей растворения лекарственных препаратов, у которых наблюдается высокая вариабельность, являются: тест, основанный на расстоянии Махаланобиса (Mahalanobis Distance Test) и метод *bootstrap* для f_2 . Рассмотрим методы более подробно.

*T*²-критерий эквивалентности

В пакете «T2EQ», который разработан для свободного программного обеспечения R, содержатся функции для применения *T*²-теста для определения эквивалентности профилей растворения. *T*²-критерий эквивалентности – это многомерный критерий эквивалентности двух выборок, данные которых распределены нормально. Мерой расстояния теста является расстояние Махаланобиса (MD). По мнению разработчиков, данный критерий является точным и равномерно наиболее мощным инвариантом. Согласно Wellek [6] функция T2EQ может применяться для оценки эквивалентности профилей СТПР ЛС. В случае высокой вариабельности лекарственного препарата расчет выполняется с помощью теста по Hoffelder [7] (функция «T2EQ.dissolution.profiles.hoffelder ()»).

Существует документ ЕМА [8], в котором содержится подробное разъяснение пригодности применения расстояния Махаланобиса в качестве инструмента для оценки эквивалентности профилей растворения лекарственных препаратов, а также подчеркнута важность доверительных интервалов для количественной оценки неопределенности вокруг выбранного показателя [фактор сходимости (f_2) или расстояние Махаланобиса].

Расстояние Махаланобиса (MD) является мерой различия между двумя случайными векторами X и Y одинаковой длины, которая учитывает корреляцию

в наборе данных. MD – это многомерная обобщенная идея выражения расстояния между двумя точками с использованием стандартного отклонения в качестве единицы измерения. Этот способ стандартизации означает, что MD зависит от оценки дисперсии и ковариации. В массиве данных процесса растворения ковариаты соответствуют значениям степени высвобождения (в процентах) АФИ из лекарственного препарата в различных временных точках. При некоторых допущениях MD становится меньше, что указывает на схожесть профилей растворения с увеличением вариабельности исследуемых данных. Такое свойство делает использование MD нежелательным при оценке сходимости профилей растворения, особенно учитывая, что пределы приемлемости критерия сопоставимости не должны превышать 10 % в любой момент времени; в зависимости от наблюдаемой вариабельности вполне возможно получить наблюдаемое различие более 10 % в какой-то момент времени, однако критерии, основанные на MD, могут признать различия несущественными. Исходя из этих соображений, подход, базируемый на расстоянии Махаланобиса, не может быть поддержан в качестве предпочтительного методологического подхода для принятия решения о сходимости профилей растворения, даже в тех ситуациях, когда f_2 не применим, как это указано в руководстве ЕМА [3].

Однако любой подход, основанный на доверительных интервалах для фактора сходимости f_2 , будет сочтен целесообразным вне зависимости от того, соответствует он или нет критериям достоверности, изложенным в руководстве ЕМА [3]. Если границы доверительного интервала для f_2 будут не менее 50, то кривые растворения будут считаться эквивалентными [8].

Хотя, независимо от того, выполняются или нет условия для адекватного применения f_2 в эксперименте по растворению, свойства распределения выборки f_2 не позволяют получить точные доверительные интервалы для адекватной количественной оценки неопределенности f_2 . Чтобы решить эту проблему, можно использовать методологию *bootstrap* для получения доверительных интервалов для f_2 на основе квантилей распределений повторной выборки, и этот подход можно считать предпочтительным методом по сравнению с f_2 и MD [8].

Методология *bootstrap* для f_2

Bootstrap-метод используется для учета случайного характера профилей растворения. Суть метода заключается в том, что из имеющегося массива данных формируется новая выборка большего размера для изучения статистических характеристик. При формировании текущего элемента «большой» выборки используется процедура извлечения из базовой выборки с возвращением. Генерация случайного номе-

ра элемента базовой выборки осуществляется с помощью метода Монте-Карло. Значение этого элемента присваивают текущему элементу «большой» выборки, тем самым реализуется ресэмплинг выборки. На основе полученной выборки численно строится приближенная функция распределения, определяют доверительные интервалы и другие статистические характеристики. Такой метод позволяет просто и быстро оценивать статистические характеристики для сложных моделей, не опираясь на априорные предположения о характере распределения [9].

Преимущества метода:

- полученная модель не привязана к какому-либо механизму высвобождения и связанной с ним физической модели;
 - дает понятный и просто интерпретируемый ответ о сходимости профилей растворения;
 - для получения модели требуется исключительно набор экспериментальных данных, которые можно получить в стандартных исследованиях по высвобождению лекарственных препаратов [9];
 - имеется доступное программное обеспечение для выполнения симуляции (DDSolver).
- Недостатки метода:
- модель носит эмпирический характер;
 - отсутствие связи с физическими процессами не позволяет использовать ее для углубленного изучения механизмов высвобождения АФИ из современных сложных многокомпонентных таблетированных форм [9];
 - нет четкого представления о возможности применения к тесту растворения для лекарственных препаратов с неполным высвобождением, в частности в биореlevantных средах.

Позиция Хоффелдера

В своей работе [10] Хоффелдер проводит сравнение применения фактора сходимости f_2 , метода bootstrap для f_2 , метода EDNE (Euclidean Distance of the Non standardized Expected values – евклидово расстояние для нестандартизованных ожидаемых значений) [11], а также T^2 -теста для определения эквивалентности высоко вариабельных лекарственных препаратов. По его мнению, применение T^2 -теста позволяет дать надежную оценку эквивалентности и имеет достаточно надежную научную базу, поскольку тест является более точным статистическим методом и прост в применении, так как не требует никаких числовых итераций. Реализация данного теста доступна в R и SAS.

Однако на практике возникают случаи, когда фактор сходимости принимает значение ниже 50 (рисунок 3), но при этом T^2 -тест делает выводы об эквивалентности профилей растворения (при условии выполнения критериев применимости f_2) (рисунок 4).

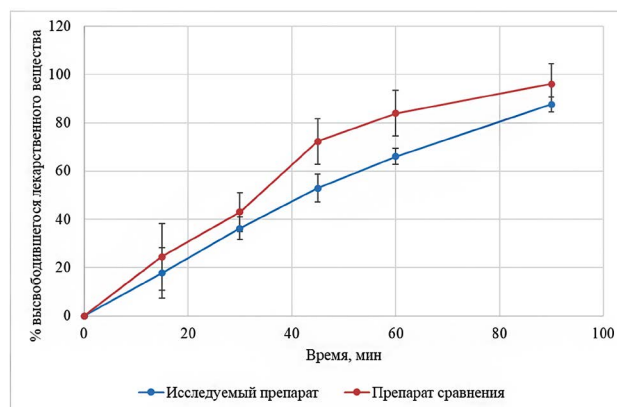


Рисунок 3. Профили растворения лопинавира, pH 1,2 ($f_2 = 44$)

Figure 3. Lopinavir dissolution profiles, pH 1,2 ($f_2 = 44$)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тема количественной статистической оценки эквивалентности профилей растворения требует дальнейшего обсуждения, поскольку по ряду объективных признаков фактор сходимости морально устарел и в ряде случаев не может быть адекватно применен. Использование современных статистических инструментов в данный момент не имеет нормативного подтверждения регулирующих органов. В существующих научных публикациях приведены некоторые статистические методы, которые сравнивались по своей конструкции и эффективности. Необходимо разработать четкий план (decision tree) процедуры проведения выбора статистического метода оценки эквивалентности профилей растворения.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission dated November 3, 2016, No. 85 «On approval of the Rules for conducting studies of bioequivalence of drugs within the framework of the Eurasian Economic Union». Available at: https://docs.eaeunion.org/ria/ru-ru/0121136/ria_30062015_att.pdf (accessed 04.04.2019) (in Russ.).
2. Guidelines for the examination of medicines. T. I. – M.: Grif and K. 2013: 328, chapter 7 (in Russ.).
3. Guidance on the Investigation of Bioequivalence. European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). 2010.
4. FDA U. S. Guidance for industry: bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CV). 2001.
5. Costa P., Lobo J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2001; 13(2): 123–133.
6. Wellek S. Testing statistical hypotheses of equivalence and noninferiority. *CRC Press*. 2010.
7. Hoffelder T. Highly variable dissolution profiles: comparison of T^2 -test for equivalence and f_2 based methods. *Pharmind*. 2016; 78(4): 587–592.
8. Question and answer on the adequacy of the Mahalanobis distance to assess the comparability of drug dissolution profiles.

```
R version 3.5.1 (2018-07-02) -- "Feather Spray"
Copyright (C) 2018 The R Foundation for Statistical Computing
Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

R -- это свободное ПО, и оно поставляется безо всяких гарантий.
Вы вольны распространять его при соблюдении некоторых условий.
Введите 'license()' для получения более подробной информации.

R -- это проект, в котором сотрудничает множество разработчиков.
Введите 'contributors()' для получения дополнительной информации и
'citation()' для ознакомления с правилами упоминания R и его пакетов
в публикациях.

Введите 'demo()' для запуска демонстрационных программ, 'help()' -- для
получения справки, 'help.start()' -- для доступа к справке через браузер.
Введите 'q()', чтобы выйти из R.

[Загружено ранее сохраненное рабочее пространство]

> local({pkg <- select.list(sort(.packages(all.available = TRUE)),graphics=TRUE)
+ if(nchar(pkg)) library(pkg, character.only=TRUE)})

*****
***** The T2-test for equivalence *****
***** Variant for comparing highly variable dissolution profiles *****
***** ( see Hoffelder (2016) ) *****
*****

Summary statistics:

Sample size of REF sample:      12
Sample size of TEST sample:     12
Sample size of pooled sample:   24
Dimension (Nr. of time points): 5
REF Mean:                      22.96417 42.96917 72.32 83.95917 96.03917
TEST Mean:                     17.75583 36.3075 52.88083 66.085 87.66083
Empirical REF covariance matrix: 7.27 1.4 -5.24 5.73 4.26 1.4 12.19 7.28 18.23 4.22 -5
.24 7.28 46.86 29.22 -16.53 5.73 18.23 29.22 62.96 17.06 4.26 4.22 -16.53 17.06 65.11
Empirical TEST covariance matrix: 3.48 0.37 1.88 0.36 -0.84 0.37 2.95 4.29 1.69 2.33 1.
88 4.29 9.39 4.88 4.1 0.36 1.69 4.88 4.79 2.54 -0.84 2.33 4.1 2.54 7.02
Pooled empirical covariance matrix: 5.38 0.88 -1.68 3.04 1.71 0.88 7.57 5.78 9.96 3.27 -1
.68 5.78 28.13 17.05 -6.22 3.04 9.96 17.05 33.88 9.8 1.71 3.27 -6.22 9.8 36.07
Estimated Mahalanobis distance: 25.2589
Equivalence margin:            39.67459
Hotelling's T2:              151.5534
Noncentrality parameter:       238.0476
Significance level:             0.05
Teststatistic:                 24.79965
Quantile of noncent. F-distribution: 28.77001
Decision in favor (1) or against (0) equivalence/similarity of dissolution profiles: 1

Test result:

p-value of the T2-test for equivalence: p = 0.01702934

Equivalence comparison successful

*****
```

Рисунок 4. Протокол пакета «T2EQ» для теста эквивалентности лопинавира

Figure 4. «T2EQ» package protocol for Equivalence Test for Lopinavir

- Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/question-answer-adequacy-mahalanobis-distance-assess-comparability-drug-dissolution-profiles_en.pdf.
9. Chorny A., Savyak R., Kondratov S. Development of a bootstrap-model for determining the release of medicinal preparations in the human organism. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2017; 3(6): 43–49 (in Ukraine).
10. Hoffelder T. Comparison of Dissolution Profiles: A Statistician's Perspective. *Therapeutic innovation & regulatory science*. 2018; 52(4): 423–429.
11. Hoffelder T., Gössl R., Wellek S. Multivariate equivalence tests for use in pharmaceutical development. *Journal of biopharmaceutical statistics*. 2015; 25(3): 417–437.
12. Diaz D. A. et al. Dissolution similarity requirements: how similar or dissimilar are the global regulatory expectations? *The AAPS journal*. 2016; 18(1): 15–22.
13. Zheng Y. et al. Rational Statistical Analysis Practice in Dissolution Profile Comparison for Product Quality Assessment of Similarity through Real Case Studies. *AAPS poster session*. San Diego, CA. 2017.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-151-158>
УДК 614.35



Оригинальная статья/Research article

Оценка взаимосвязи между отклонениями от требований GMP и потенциальными дефектами качества лекарственной продукции: результаты опроса уполномоченных лиц

В. А. Орлов^{1,2*}, В. Н. Шестаков¹

1 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» (ФБУ «ГИЛС и НП»), 109044, Россия, г. Москва, Лавров пер., д. 6

2 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФ Минздрава России), кафедра экономики и управления, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14

*Контактное лицо: Орлов Владимир Александрович. E-mail: orlov@gilsinp.ru, orlov@ispe.ru

Статья получена: 09.03.2020. Статья принята к печати: 13.04.2020

Резюме

Введение. Одним из принципиальных вопросов в сфере оценки соответствия производителей лекарственных средств требованиям надлежащей производственной практики (GMP) является систематизированная методология классификации выявляемых нарушений (несоответствий, отклонений) по уровню их критичности. Представленные на сегодняшний день в нормативных документах сведения в части определений критических, существенных и несущественных (прочих) несоответствий не во всех случаях являются достаточными для их использования как в практике GMP-инспектирования и аудита, так и в системах управления качеством на фармацевтических предприятиях. В целях изучения подходов к классификации выявляемых отклонений от требований GMP, используемых в практике работы уполномоченных лиц производителей лекарственных средств в Российской Федерации, проведено исследование в форме анкетирования. Данная работа явилась логическим продолжением проведенного ранее исследования среди сотрудников фармацевтического инспектората Российской Федерации.

Цель. Установление взаимосвязей между классификацией критических и существенных отклонений от требований GMP и потенциально вызываемыми ими дефектами качества лекарственной продукции I и II классов опасности.

Материалы и методы. Исследование базировалось на опросе уполномоченных лиц производителей лекарственных средств (всего 56 респондентов) по специально разработанной анкете. Основная гипотеза исследования состоит в том, что специалисты (уполномоченные лица), которые принимают решения о классификации отклонений от требований GMP, ориентируются именно на потенциальные дефекты качества, которые могут быть вызваны указанными отклонениями. В рамках исследования использована существующая в руководствах PIC/S и ЕМА модель градации дефектов (нарушений показателей) качества лекарственных средств с разделением на I, II и III класс по степени их значимости (опасности). В то же время, как известно, для отклонений от требований GMP также используется трехуровневая система градации: критические, существенные и несущественные (прочие). При разработке анкет для проведения опроса акцент был сделан на примеры дефектов качества I и II классов и, соответственно, критические и существенные отклонения от GMP.

Результаты и обсуждения. Результаты обработки и анализа анкет резюмируют позицию большинства респондентов о прямой взаимосвязи между дефектами качества лекарственной продукции наиболее высокой степени опасности (класс I) и критическими отклонениями от требований GMP. Респонденты также высказали мнение о том, что отклонения, способные спровоцировать возникновение дефектов качества лекарственной продукции II класса опасности, в большинстве случаев следует классифицировать как критические. Полученные в ходе исследования результаты также свидетельствуют о схожести существующих подходов к классификации выявляемых отклонений (несоответствий) от требований GMP между уполномоченными лицами производителей лекарственных средств и фармацевтическими инспекторами.

Заключение. Итоги проведенного исследования показывают, что при классификации (определении критичности) выявляемых отклонений от требований надлежащей производственной практики (GMP) есть возможность использовать систему градации дефектов качества лекарственной продукции по степени их опасности для потребителя (пациента), представленную в нормативно-правовых документах ЕС и руководствах PIC/S. Результаты исследования также позволяют сделать вывод о том, что на сегодняшний день не только с позиции регуляторных органов, но и со стороны предприятий фармацевтической промышленности отмечается потребность в разработке методических руководств с фокусом внимания на риск-ориентированной классификации выявляемых отклонений (несоответствий) от требований GMP по степени критичности, учитывающей их потенциальное влияние на возникновение дефектов качества лекарственной продукции и, как следствие, угрозы жизни и здоровью потребителей (пациентов).

Ключевые слова: надлежащая производственная практика, GMP, уполномоченные лица, PIC/S, ЕАЭС, ЕМА, ФБУ «ГИЛС и НП», несоответствия, отклонения, инспектирование, качество, лекарственное средство, регуляторный орган, гармонизация, риск, дефект качества.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. В. Н. Шестаков и В. А. Орлов составили перечень вопросов для проведения исследования (анкетирования) уполномоченных лиц. В. А. Орлов разработал форму анкеты для проведения исследования и провел статистическую обработку полученных результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов, их интерпретации, а также в написании текста статьи.

Для цитирования: Орлов В. А., Шестаков В. Н. Оценка взаимосвязи между отклонениями от требований GMP и потенциальными дефектами качества лекарственной продукции: результаты опроса уполномоченных лиц. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020; 9(2): 151–158.

Assessing the Correlation Between GMP Deviations and Potential Quality Defects of Medicinal Products: the Result of the Survey of Qualified Persons

Vladimir A. Orlov^{1,2*}, Vladislav N. Shestakov¹

1 – State Institute of Drugs and Good Practices, 6, Lavrov lane, Moscow, 109044, Russia

2 – Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, Department of Economics and Management, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Vladimir A. Orlov. E-mail: orlov@gilsinp.ru, orlov@ispe.ru

Received: 09.03.2020. Accepted: 13.04.2020

© Орлов В. А., Шестаков В. Н., 2020

© Orlov V. A., Shestakov V. N., 2020

Abstract

Introduction. One of the key issues in the field of assessing the conformity of drug manufacturers with the requirements of good manufacturing practice (GMP) is a systematic methodology for classifying revealed deficiencies (deviations, non-conformities) by their level of criticality. Today the information included into regulatory documents regarding the definitions of critical, major and minor (other) deficiencies is not always sufficient for the use in GMP inspection practice, as well as in quality management systems of the pharmaceutical manufacturers. In terms to study approaches to the classification of GMP deviations applied in the practice of the Qualified persons of drug manufacturers in the Russian Federation, a survey was conducted in the form of a questionnaire. This work became a logical continuation of a previous study among employees of the pharmaceutical inspectorate of the Russian Federation.

Aim. To identify the correlation between the classification of critical and major GMP deviations and potential class I and II quality defects of medicinal products.

Materials and methods. The study was based on a survey of Qualified persons of drug manufacturers (56 respondents) using a questionnaire specially designed. The main hypothesis of the study is that specialists (Qualified persons) who make decisions on the classification of GMP deviations are guided by potential quality defects that may be caused by the indicated deviations. In the framework of the study, authors used the model of gradation of quality defects of the medicinal products into 3 classes (class I, II and III) according to the rate of their significance as indicated in the PIC/S and EMA guidelines. At the same time, for GMP deviations a three-level gradation system is also used: Critical, Major and Minor (Other). In designing of questionnaires for the survey, the focus was made on examples of quality defects of classes I and II and, accordingly, Critical and Major GMP deviations.

Results and discussion. The results of the processing and analysis of questionnaires summarize the opinion of the majority of respondents about the direct relationship between product quality defects of the high risk (class I) and critical GMP deviations. Respondents also expressed the opinion that deviations that could trigger the occurrence of the class II quality defects in most cases will be classified as critical. The results obtained during the study also indicate the similarity of existing approaches of the classification of GMP deviations (deficiencies) between QPs of the drug manufacturers and pharmaceutical inspectors.

Conclusion. The results of the study show that for the purpose of classifying (determining the criticality) of GMP deviations (deficiencies), it is possible to use the rating system for the quality defects of medicinal products by the rate of their significance for the patient which is presented in EU regulatory documents and PIC/S guidelines. The results of the study also will facilitate the drawing of conclusions that today, not only from the position of regulatory authorities, but also for the pharmaceutical industry, there is a need to develop methodological guidelines with a focus on a risk-based classification of GMP deviations (deficiencies). These guidelines should take into account the potential impact of the mentioned GMP-deviations on the occurrence of the quality defects of medicinal products and, as a result, threats to the life and health of patients.

Keywords: good manufacturing practice, Qualified person, GMP, PIC/S, EMA, FSI «SID&GP», deficiency, deviation, non-conformity, inspection, quality, medicine, authority, harmonization, risk, quality defect.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Vladislav Shestakov and Vladimir Orlov compiled a list of questions for the survey of Qualified persons. Vladimir Orlov developed a questionnaire form for the survey and conducted statistical processing of the results. Both authors took part in the discussion of the results, their interpretation, as well as in the writing of the text of the article.

For citation: Orlov V. A., Shestakov V. N. Assessing the correlation between GMP deviations and potential quality defects of medicinal products: the result of the survey of qualified persons. *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 151–158.

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения (несоответствия, отклонения) требований GMP, как правило, принято делить на три основные группы – *критические, существенные и несущественные (прочие)*, при этом базовым критерием классификации является потенциальное влияние выявленных нарушений на жизнь и здоровье пациентов. В большинстве случаев ключевым связующим звеном между выявленным несоответствием требованиям GMP и возможным риском для жизни и здоровья пациента выступает его негативное воздействие на показатели качества лекарственного средства.

На сегодняшний день не представлена какая-либо база статистических данных, позволяющая изучить зависимость между нарушениями требований GMP и возникновением тех или иных дефектов качества лекарственной продукции. Исторически в фармацевтической отрасли на отдельных производствах складывались определённые «внутренние» представления о таких взаимосвязях, которые в большей степени базировались на собственном производственном опыте и знаниях свойств выпускаемой продукции. В то же время прослеживается тенденция к постепен-

ной трансформации этих представлений под влиянием изменений в нормативно-правовых требованиях и рекомендациях к обращению ЛС. Однако четких и однозначных указаний на то, как следует классифицировать выявляемые отклонения от требований GMP с позиции их взаимосвязи с предполагаемыми дефектами качества продукции и, в конечном итоге, влиянием на потребителей (пациентов), в действующих нормативно-правовых документах не предусмотрено. В результате решение вопроса о классификации отклонений от GMP с точки зрения рисков для жизни и здоровья пациентов принимают конкретные отраслевые специалисты, оказавшиеся перед необходимостью принимать такие решения.

В качестве гипотезы исследования нами было высказано предположение, что решения о классификации отклонений от требований GMP по уровню критичности принимаются специалистами исходя из того, как они определяют риски для качества лекарственных препаратов, потенциально связанные с этими отклонениями. Изучению вопроса о том, как отраслевые специалисты выстраивают взаимосвязь между категориями отклонений от требований GMP и по-

тенциально вызываемыми ими дефектами качества, посвящено несколько проведенных нами опросов.

В первом исследовании [1] было проведено анкетирование сотрудников фармацевтического инспектората Российской Федерации. Результаты показали, что при оценке критичности выявляемых несоответствий требованиям GMP сотрудники инспектората считают возможным ориентироваться на представленную в руководящих документах ЕМА [2] и PIC/S [3] градацию дефектов качества лекарственной продукции по степени опасности для потребителя (пациента). В ответах респондентов устанавливается определенная взаимосвязь между критическими и существенными отклонениями и, соответственно, дефектами качества наиболее высокой степени опасности (класс I) и средней степени опасности (класс II).

Наряду с сотрудниками фармацевтического инспектората, в сферу компетенций которых входит классификация несоответствий, выявляемых в ходе проводимых инспекций на соответствие GMP, схожие по сути действия осуществляются и уполномоченными лицами производителей лекарственных средств. В сферу ответственности уполномоченных лиц (далее – УЛ) при определении возможности выпуска серии лекарственного препарата в обращение входит и оценка влияния выявленных отклонений от требований GMP на показатели качества продукции. При этом базовые принципы организации работы УЛ на фармацевтическом предприятии, предусмотренные действующим законодательством ЕС, ЕАЭС и РФ, наделяют УЛ независимостью в принятии решений по ключевым вопросам, связанным с качеством производимых лекарственных препаратов. К их числу относится и оценка результатов расследования отклонений от GMP, возникающих в ходе производственного этапа жизненного цикла препарата. Необходимая квалификация и соответствующая аттестация УЛ являются одними из требований действующего законодательства [4]. Таким образом, УЛ, как и фармацевтические инспекторы, используют в своей работе подходы к определению критичности (классификации) выявляемых отклонений/несоответствий от требований GMP и, следовательно, также могут быть задействованы в качестве респондентов в проводимых исследованиях.

Терминологические различия, закрепленные в нормативной документации, состоят в том, что работа фармацевтических инспекторов связана с выявлением *несоответствий* требованиям GMP, в то время как в отношении УЛ в рамках внутренней работы на производственных площадках принято говорить об оценке и работе с *отклонениями* от требований GMP. Можно сказать, что фармацевтический инспектор является лицом, осуществляющим выявление и оценку нарушений требований GMP «извне» (со стороны), в то время как УЛ осуществляют данную работу на «внутреннем контуре». Далее в статье будут использоваться термин

несоответствие в отношении деятельности фармацевтических инспекторов и термин *отклонение* в отношении работы УЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Перед авторами стояла цель установления взаимосвязей между классификацией отклонений от требований GMP и потенциально вызываемыми ими дефектами качества лекарственной продукции на основании опроса УЛ отечественных производителей лекарственных средств.

В рамках данной работы было проведено анкетирование 56 действующих УЛ, занятых в сфере производства лекарственных средств различных видов и групп, проходивших образовательные курсы на базе Центра повышения квалификации специалистов Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета и кафедры промышленной фармации Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова в течение 2019 года.

Исследование включало в себя следующие задачи:

- получить информацию об использовании респондентами регламентирующих документов (а также оценку достаточности представленных в них сведений), содержащих указания относительно классификации выявляемых отклонений от требований GMP по уровню критичности;
- получить информацию о наличии в системе управления качеством компаний-производителей лекарственных средств, в которых заняты опрошиваемые УЛ, внутренней процедуры, описывающей подходы и критерии оценки выявляемых отклонений;
- оценить необходимость наличия подробного регламентирующего документа, содержащего примеры определения уровней критичности выявляемых отклонений от требований GMP;
- выяснить мнения респондентов относительно необходимости наличия определённого уровня знаний в области медицины для определения потенциальных рисков для жизни и здоровья пациента при классификации выявляемых отклонений;
- выяснить мнения респондентов относительно практической возможности прослеживания взаимосвязи между потенциальным вредом здоровью или жизни человека (пациента) и конкретными дефектами качества лекарственного средства;
- выяснить представление респондентов относительно возможной классификации отклонений в качестве критических и существенных, являющихся причиной предлагаемых к рассмотрению некоторых из примеров дефектов качества лекарственного средства, относящихся к I и II классу опасности;
- выяснить мнение респондентов об иных отклонениях, не связанных напрямую с дефектами качества продукции, которые могут быть отнесены критическим и существенным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование показало, что большинство респондентов из числа УЛ указывают на использование в своей рутинной работе, в первую очередь, *приказа Минпромторга России от 04.02.2016 № 261* (таблица 1). Аналогичные результаты были получены также при опросе сотрудников фармацевтического инспектората [1].

Более половины (54 %) УЛ указывают на использование *Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 83 «Об утверждении Правил проведения фармацевтических инспекций»* [7], из числа сотрудников фармацевтического инспектората – это только 36 %. Указанный факт может свидетельствовать о возрастающем внимании отечественных производителей к подготовке и прохождению оценки на соответствие требованиям GMP ЕАЭС наряду с требованиями национальных правил GMP. Также следует отметить [8], что приведенные в Решении № 83 определения классификации отклонений/несоответствий требованиям GMP в большей степени гармонизированы с действующими документами ЕС, нежели соответствующие определения из приказа Минпромторга России от № 261.

Обращает на себя внимание тот факт, что 36 % УЛ отмечают также использование в своей работе *«Руководство PIC/S по классификации выявляемых несоответствий требованиям GMP» (PI 040-1)* [6], которое было официально опубликовано лишь в начале 2019 года. *Шаблон отчёта по результатам GMP-инспектирования ЕС* [5] пользуются 16 % респондентов (таблица 1).

При ответе на вопрос о достаточности сведений, приведённых в основных регламентирующих документах относительно классификации отклонений (несоответствий) от требований GMP (рисунок 1), голоса респондентов разделились примерно поровну: часть респондентов отметила нехватку указанных сведений, другая часть – сочла существующую нормативно-правовую базу не нуждающейся в дополнении. В то же



Рисунок 1. Являются ли достаточными представленные в перечисленных документах указания по определению уровней критичности выявляемых отклонений?

Figure 1. Are the guidelines provided in the listed documents for determining the criticality levels of revealed deviations sufficient?

время на вопрос о необходимости наличия подробного регламентирующего документа, содержащего примеры определения уровней критичности выявляемых отклонений, подавляющее большинство респондентов ответило утвердительно (рисунок 2). По этому вопросу УЛ солидарны с сотрудниками инспектората, что свидетельствует о существующей потребности у фармацевтической отрасли в разработке методических рекомендаций по классификации отклонений (несоответствий) от требований GMP в дополнение к существующей нормативно-правовой базе документов.

Далее респондентам был задан вопрос о наличии в системе управления качеством фармацевтических компаний, сотрудниками которых они являются, внутренней процедуры, описывающей подходы и критерии оценки выявляемых отклонений. Получение сведений по данному вопросу является важной составляющей проведённого исследования, так как наличие подобной внутренней регламентирующей процедуры в

Таблица 1. Регламентирующие документы, содержащие указания относительно классификации выявленных отклонений по уровню критичности, которые респонденты используют в своей работе*

Table 1. Regulatory documents containing guidance on the classification of revealed deviations by criticality level that respondents use in their work*

Предложенные варианты ответа	Приказ Минпромторга России от 04.02.2016 № 261 [9]	Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 83 [7]	Европейский союз (ЕС): формат шаблона отчёта по результатам GMP-инспектирования [5]	Руководство Министерства здравоохранения Канады «Risk classification guide for drug good manufacturing practices observations (GJI-0023)» [10]	PIC/S inspection report format (PI 013-3) [11]	Руководство PIC/S по классификации выявляемых несоответствий требованиям GMP (PI 040-1) [6]	Иные документы
Доля положительных ответов, полученных от общего числа респондентов	79 %	54 %	23 %	13 %	18 %	36 %	16 %

Примечание: *респондентам была предложена возможность выбора одновременно нескольких вариантов ответа.

Note: *respondents were offered the opportunity to select several answers at once.



Рисунок 2. Является ли необходимым наличие подробного руководства по классификации отклонений от требований GMP, учитывающего взаимосвязь между выявляемыми отклонениями, потенциальными дефектами качества продукции и рисками для жизни и здоровья пациента?

Figure 2. Is it necessary to have a detailed manual on the classification of deviations from GMP requirements, taking into account the relationship between revealed deviations, potential product quality defects and risks to the life and health of the patient?

структуре документации фармацевтической системы качества производителей лекарственных средств является одним из базисов структурированной и систематизированной работы с выявляемыми отклонениями, а также с результатами их расследования и оценки. Подавляющее число респондентов (91 %) ответило на этот вопрос утвердительно, что свидетельствует о наличии требуемой документальной основы для надлежащей работы по данному направлению.

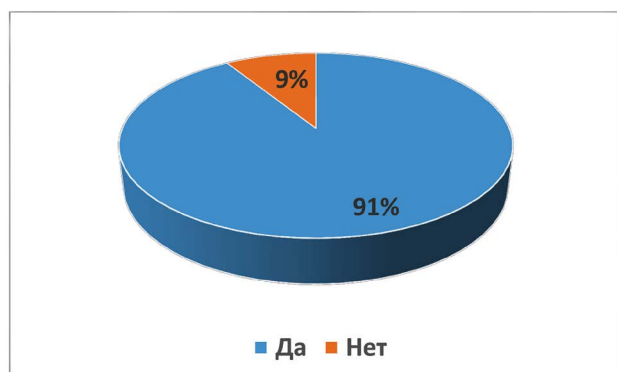


Рисунок 3. Разработана ли в системе управления качеством Вашей компании внутренняя процедура, описывающая подходы и критерии оценки выявляемых отклонений?

Figure 3. Has your company's quality management system developed an internal procedure that describes the approaches and criteria for assessing revealed deviations?

Значимый интерес вызывают результаты ответов респондентов на вопрос о необходимости наличия определённого уровня знаний в области медицины для достоверного определения потенциальных рисков жизни и здоровью пациентов при классификации выявляемых отклонений. Результаты анкети-

рования свидетельствуют, что основная часть респондентов (75 %) высказалась за необходимость наличия указанных знаний (рисунок 4). Данная тенденция в полной мере соответствует актуальным требованиям нормативно-правовой базы в области подготовки УЛ как на территории ЕАЭС, так и в Европейском союзе. В частности, согласно Решению № 73 Совета Евразийской экономической комиссии о порядке аттестации УЛ производителей лекарственных средств [12], аттестуемое УЛ помимо наличия законченного высшего образования по одному из соответствующих направлений должно иметь документированное подтверждение пройденного обучения, в т. ч. по таким дисциплинам медицинского направления, как физиология, токсикология и фармакология. Если же говорить о требованиях в рамках ЕС, то согласно положениям статьи 49 Директивы ЕС № 2001/83/ЕС [13], УЛ производителя лекарственных средств для медицинского применения также должно пройти обучение по приведённым дисциплинам (общее требование) или подтвердить наличие соответствующих знаний по ним (в ряде случаев). Очевидно, что надлежащая подготовка УЛ, в т. ч. в области медицинских дисциплин, является неотъемлемой составляющей их базовой подготовки, необходимой для квалифицированного выполнения основных профессиональных функций, включая оценку отклонений от требований GMP, дефектов качества лекарственных средств и потенциальных последствий для пациента от применения препаратов ненадлежащего качества. При этом важно отметить, что в существующей законодательной базе Российской Федерации однозначное требование о прохождении УЛ соответствующего обучения по отдельным дисциплинам, в т. ч. медицинского направления, не представлено.

В полученных ответах на вопрос о связи дефектов качества лекарственного средства с потенциальным риском для жизни и здоровья пациента (рисунок 5)



Рисунок 4. Является ли необходимым наличие определённого уровня знаний в области медицины (фармакологии, физиологии и пр.) для того, чтобы иметь возможность определять потенциальные риски для жизни и здоровья пациента при классификации выявляемых отклонений?

Figure 4. Is it necessary to have a certain level of knowledge in the field of medicine (pharmacology, physiology, etc.) in order to be able to determine the potential risks to the life and health of the patient when classifying the revealed deviations?

прослеживается схожая картина с результатами анкетирования сотрудников фармацевтического инспектората. В обоих случаях респонденты в своём большинстве (82 % и 96 % соответственно) ответили на предложенный вопрос утвердительно. Данные результаты свидетельствуют об единообразии позиций УЛ и фармацевтических инспекторов относительно прямой зависимости между дефектами качества лекарственного средства в части его несоответствия требованиям установленной спецификации и потенциальным риском для жизни и здоровья пациента.



Рисунок 5. Возможно ли связать потенциальный риск для жизни и здоровья пациента с конкретными дефектами качества лекарственного средства, принимая во внимание показатели спецификации лекарственного средства?

Figure 5. Is it possible to relate the potential risk to the life and health of the patient with specific drug quality defects, taking into account the specification of the drug?

В числе ключевых пунктов анкеты фигурировал комплексный вопрос, связанный с рассмотрением распространенных примеров дефектов качества лекарственной продукции (таблица 2). Респондентам было предложено самостоятельно ранжировать связанные с ними отклонения от требований GMP по уровню критичности на существенные и критические. При этом опрашиваемые УЛ при оценке того или иного примера дефекта качества продукции не были лимитированы в указании исключительно одного из вариантов классификации отклонения (существенного или критического).

Как и в случае с сотрудниками фармацевтического инспектората, опрошенные УЛ в подавляющем большинстве определяют прямую взаимосвязь между дефектами качества I класса и критическим уровнем потенциально вызывающих их отклонений от требований GMP. В то же время большинство дефектов качества II класса респондентами также были квалифицированы как результат потенциально критических отклонений. В частности, такие примеры дефектов качества, как отсутствие или неправильная информация в инструкциях по медицинскому применению, химическая/физическая контаминация продукции (примеси, мех. частицы...), несоответствие требованиям спецификации по количественному содержанию действующих веществ (АФС), а также нарушение

стабильности ЛС в течение срока годности, относящиеся ко II классу опасности (согласно указаниям ЕМА и PIC/S), были отнесены респондентами к возможным следствиям критического нарушения требований GMP. Полученные результаты подтверждают и даже усиливают выводы, сделанные по результатам предшествующего исследования среди сотрудников фармацевтического инспектората: выявляемые отклонения, являющиеся потенциальной причиной возникновения дефектов качества II класса опасности, во многих случаях классифицируются как критические.

Таблица 2. Классификация отклонений, являющихся потенциальными причинами дефектов качества лекарственного средства*

Table 2. Classification of deviations that cause the potential drug quality defects*

Дефект качества (предложенный вариант ответа)	Классификация отклонения, которое явилось причиной возникновения дефекта качества (количество ответов респондентов в процентах)	
	Критическое	Существенное
Перепутывание: ошибка в названии ЛС (несовпадение содержимого упаковки с этикеткой ЛС)	100 %	–
Перепутывание действующего вещества (АФС), входящего в состав ЛС	100 %	–
Грубая ошибка в отображении дозировки ЛС	98 %	2 %
Микробиологическая контаминация стерильного ЛС	100 %	–
Значительная химическая контаминация ЛС действующим веществом (АФС) другого ЛС	98 %	2 %
Ошибки в тексте/рисунках применительно к маркировке	32 %	68 %
Отсутствие или неправильная информация в инструкциях по медицинскому применению	68 %	34 %
Значительная микробиологическая контаминация нестерильной продукции	55 %	46 %
Химическая/физическая контаминация продукции (примеси, мех. частицы...)	79 %	23 %
Несоответствие требованиям спецификации по количественному содержанию действующих веществ (АФС)	80 %	23 %
Несоответствие ЛС требованиям спецификации по объёму/массе	46 %	61 %
Нарушение стабильности ЛС в течение срока годности	71 %	32 %
Перепутывание вспомогательных компонентов в составе ЛС	68 %	36 %
Иное	5 %	7 %

Примечание: *Респондентам была предложена возможность выбора одновременно обоих вариантов ответа по каждому из пунктов.

Note: *Respondents were offered the opportunity to choose both answers at the same time for each item.

В качестве заключительного пункта анкеты респондентам было предложено определить классификацию критичности отклонений (в качестве существенных или критических), напрямую не связанных с дефектами качества продукции. В числе общего списка фигурировали некоторые примеры из действующих документов ЕАЭС, ЕМА и PIC/S. Из числа полученных ответов следует отметить практически единогласное (91 % голосов) отнесение респондентами отклонений, связанных с выявлением фактов фальсификации данных, продукции и процессов, к категории критических, что соответствует актуальным регуляторным тенденциям в сфере GMP (таблица 3). Также обращает на себя внимание присвоение большинством респондентов статуса критических тем отклонениям, которые с точки зрения действующих нормативных требований с более высокой вероятностью могли бы быть классифицированы в качестве существенных, например:

- неспособность уполномоченного лица инспектируемого субъекта выполнять свои должностные обязанности;
- отклонение, свидетельствующее о значительном нарушении требований лицензии на производство ЛС.

Таблица 3. Классификация отклонений, не связанных напрямую с дефектами качества продукции*

Table 3. Classification of deviations not directly related to product quality defects*

Отклонения (предложенный вариант ответа)	Классификация отклонения (количество ответов респондентов в процентах)	
	Критическое	Существенное
Отклонения, связанные с фактами выявления фальсификации процессов, продукции или данных	91 %	9 %
Неспособность производителя осуществлять серийный выпуск лекарственных препаратов однородного качества	50 %	48 %
Неспособность уполномоченного лица инспектируемого субъекта выполнять свои должностные обязанности	61 %	39 %
Отклонение, которое свидетельствует о значительном нарушении требований лицензии на производство ЛС	68 %	34 %
Отклонение, способное привести к получению продукции, не соответствующей требованиям регистрационного досье	71 %	27 %
Иное	2 %	4 %

Примечание: *Респондентам была предложена возможность выбора одновременно обоих вариантов ответа по каждому из пунктов.

Note: *Respondents were offered the opportunity to simultaneously choose both answer options for each item.

Одновременно значительное число респондентов (более 70 %) присваивает статус критического отклонению, которое способно привести к получению лекарственного средства, не соответствующего требованиям регистрационного досье. Это соответствует тенденции, выявленной ранее при анкетировании сотрудников фармацевтического инспектората: подобные несоответствия требованиям регистрационного досье зачастую классифицируются в качестве критических, независимо от того, несут они в себе непосредственную угрозу для жизни и здоровья пациента или нет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования в виде анкетирования уполномоченных лиц отечественных производителей лекарственных средств свидетельствуют о том, что при классификации (определении критичности) выявляемых отклонений от требований надлежащей производственной практики (GMP) в качестве потенциальных ориентиров можно использовать уже представленную в нормативно-правовых документах ЕС и руководствах PIC/S градацию дефектов качества лекарственной продукции по степени их опасности для потребителя (пациента). Итоги обработки и анализа анкет резюмируют мнения респондентов о прямой взаимосвязи между дефектами качества лекарственной продукции наиболее высокой степени опасности (класс I) и критическими отклонениями от требований GMP. Кроме того, в ходе исследования выявлена тенденция к отнесению в большинстве случаев отклонений, способных привести к возникновению дефектов качества продукции II класса опасности, к классу критических.

Полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют о схожести существующих подходов к классификации выявляемых отклонений (несоответствий) от требований GMP между фармацевтическими инспекторами и УЛ производителей лекарственных средств.

Аналогично итогам опроса сотрудников фармацевтического инспектората [1], результаты проведенного исследования среди УЛ позволяют сделать вывод о том, что на сегодняшний день не только с позиции регуляторных органов, но и со стороны предприятий фармацевтической промышленности отмечается потребность в разработке методического руководства, в фокусе внимания которого должна лежать систематизация работы с выявляемыми отклонениями (несоответствиями) от требований надлежащей производственной практики (GMP). Основой для их объективной и достоверной классификации может служить риск-ориентированная оценка потенциальных дефектов качества лекарственной продукции, которые могут явиться следствием указанных нарушений требований GMP.

ЛИТЕРАТУРА

1. Орлов В. А., Шестаков В. Н. Оценка взаимосвязи между отклонениями от требований GMP и потенциальными дефектами качества лекарственной продукции: результаты опроса сотрудников фармацевтического инспектората. *Ремедиум*. 2020; (1-2-3): 60–67.
2. Procedure for Handling Rapid Alerts Arising from Quality Defects. European Commission. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/compilation-community-procedures-inspections-exchange-information_en.pdf#%5B%7B%22num%22%3A39%2C%22gen%22%3A0%7D%2C%7B%22name%22%3A%22XYZ%22%7D%2C191%2C551%2C0%5D.
3. Procedure for handling rapid alerts and recalls arising from quality defects. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. Available at: <https://picscheme.org/layout/document.php?id=1140>.
4. Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 № 61-ФЗ. КонсультантПлюс. Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350.
5. GMP Inspection Report – Union Format. European Commission. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/compilation-community-procedures-inspections-exchange-information_en.pdf#%5B%7B%22num%22%3A371%2C%22gen%22%3A0%7D%2C%7B%22name%22%3A%22XYZ%22%7D%2C374%2C619%2C0%5D.
6. PIC/S Guidance on Classification of GMP Deficiencies. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. Available at: <https://picscheme.org/layout/document.php?id=1609>.
7. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 83 «Об утверждении Правил проведения фармацевтических инспекций». Евразийская экономическая комиссия. Available at: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411936/cncd_21112016_83.
8. Орлов В. А., Шестаков В. Н. Проблемы классификации несоответствий требованиям GMP: регуляторный опыт. *Ремедиум*. 2019; (1-2): 48–54.
9. Приказ Минпромторга России от 04.02.2016 № 261 «Об утверждении форм заявления о выдаче заключения о соответствии производителя (иностранного производителя) лекарственных средств для медицинского применения требованиям правил надлежащей производственной практики, инспекционного отчета по результатам инспектирования производителя и иностранного производителя лекарственных средств для медицинского применения на соответствие требованиям правил надлежащей производственной практики и заключения о соответствии производителя (иностранного производителя) лекарственных средств для медицинского применения требованиям правил надлежащей производственной практики» (Зарегистрировано в Минюсте России 09.03.2016 № 41341). КонсультантПлюс. Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_195085.
10. Risk classification guide for drug good manufacturing practices observations. Health Canada. Available at: <https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/documents/services/drugs-health-products/compliance-enforcement/good-manufacturing-practices/guidance-documents/risk-classification-drug-gmp-observations-0023-eng.pdf>.
11. PIC/S INSPECTION REPORT FORMAT. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. Available at: <https://picscheme.org/layout/document.php?id=137>.
12. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 73 «О Порядке аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств». Евразийская экономическая комиссия. Available at: http://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411909/cncd_21112016_73.
13. DIRECTIVE 2001/83/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. Available at: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2001_83_consol_2012/dir_2001_83_cons_2012_en.pdf.

REFERENCES

1. Orlov V. A., Shestakov V. N. Assessing the relationship between deviations from GMP requirements and potential quality defects of medicinal products: a survey of employees of the pharmaceutical inspectorate. *Remedium*. 2020; (1-2-3): 60–67 (in Russ.).
2. Procedure for Handling Rapid Alerts Arising from Quality Defects. European Commission. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/compilation-community-procedures-inspections-exchange-information_en.pdf#%5B%7B%22num%22%3A39%2C%22gen%22%3A0%7D%2C%7B%22name%22%3A%22XYZ%22%7D%2C191%2C551%2C0%5D.
3. Procedure for handling rapid alerts and recalls arising from quality defects. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. Available at: <https://picscheme.org/layout/document.php?id=1140>.
4. Federal law «On circulation of medicines» No. 61-FZ dated by 12.04.2010. ConsultantPlus. Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350 (in Russ.).
5. GMP Inspection Report – Union Format. European Commission. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/compilation-community-procedures-inspections-exchange-information_en.pdf#%5B%7B%22num%22%3A371%2C%22gen%22%3A0%7D%2C%7B%22name%22%3A%22XYZ%22%7D%2C374%2C619%2C0%5D.
6. PIC/S Guidance on Classification of GMP Deficiencies. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. Available at: <https://picscheme.org/layout/document.php?id=1609>.
7. Decision of Council of the Eurasian Economic Union Commission No. 83 dated by 3.11.2016 «On approval of the rules for conducting the pharmaceutical inspections». Eurasian Economic Union. Available at: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411936/cncd_21112016_83 (in Russ.).
8. Orlov V. A., Shestakov V. N. Classification issues of GMP inspection deficiencies: regulatory practices. *Remedium*. 2019; (1-2): 48–54 (in Russ.).
9. Decree of the Ministry of Industry and Trade of Russia dated by 04.02.2016 No. 261 «On approval of application forms for issuing a conclusion on the conformity of a manufacturer (foreign manufacturer) of medicines for human use with the requirements of the rules of good manufacturing practice, an inspection report on the results of inspections of the manufacturers and foreign manufacturers of medicines for human use for compliance with the requirements of the rules of good manufacturing practice and the conclusion on the conformity of the manufacturer (foreign producer) of medicines for human use with the requirements of the rules of good manufacturing practice» (Registered in the Ministry of Justice of Russia on 09.03.2016 No. 41341). Consultant Plus. Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_195085 (in Russ.).
10. Risk classification guide for drug good manufacturing practices observations. Health Canada. Available at: <https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/documents/services/drugs-health-products/compliance-enforcement/good-manufacturing-practices/guidance-documents/risk-classification-drug-gmp-observations-0023-eng.pdf>.
11. PIC/S INSPECTION REPORT FORMAT. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. Available at: <https://picscheme.org/layout/document.php?id=137>.
12. Decision of Council of the Eurasian Economic Union Commission No. 73 dated by 3.11.2016 «On the procedure for the certification of Qualified persons of drug manufacturers». Eurasian Economic Union. Available at: http://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411909/cncd_21112016_73 (in Russ.).
13. DIRECTIVE 2001/83/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. Available at: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2001_83_consol_2012/dir_2001_83_cons_2012_en.pdf.

Серия тестеров растворения ERWEKA DT light

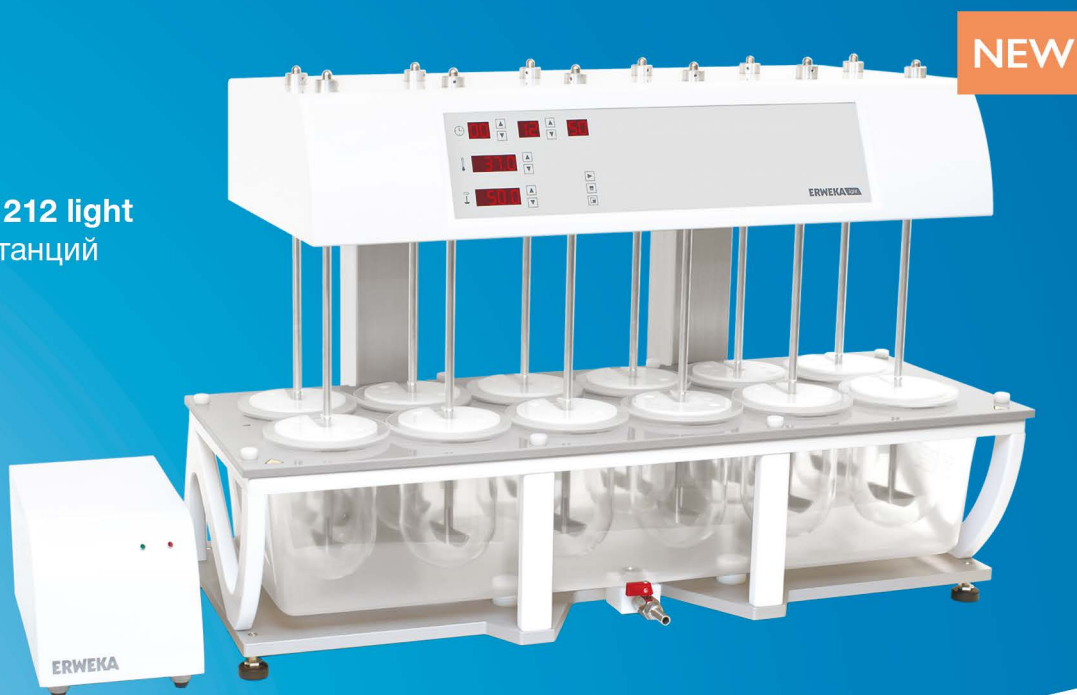
Экономичные тестеры с ручным отбором проб



DT 126 light
6 станций

DT 128 light
8 станций

DT 1212 light
12 станций



ООО «ЭРВЕКА»

Тел.: +7 (499) 110 90 60

sales@erweka-russia.ru

ERWEKA light

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 науки:

- 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

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=hdac5rtkb73ae013ofk4g8nrv1>)

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). 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-гю 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; σ – 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 подписочной подписью на русском и английском языках. В подписочных подписях не должно быть аббревиатур. Внутрисуточные 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 подписочных 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.

Первая в Сибири международная выставка оборудования, сырья и услуг для производства фармацевтических препаратов и форум для специалистов фармацевтической отрасли.

Международная
выставка-форум



ТЕХНО ФАРМ
С И Б И Р Ь

27 и 28 октября 2020 г.

**NOVOSIBIRSK
EXPO CENTRE**

Ждём Вас на выставке!



Для бесплатного посещения выставки, пожалуйста, заполните форму на сайте.

Организаторы
ООО ТехноФарм
www.techno-farm.com

 @technopharm_sib
expo@techno-farm.com

+ 7-913-891-39-39 (по вопросам участия)

+ 7-913-003-77-75

(по вопросам рекламных и спонсорских возможностей)

+ 7-961-216-99-51

(регистрация посетителей)

www.technopharm-siberia.com

Комплексные доклинические исследования лекарственных препаратов позволяют получить данные о безопасности, качестве и эффективности лекарственных средств:

- изучение общетоксических свойств (острая и хроническая токсичность)
- оценка местнораздражающего действия
- специфические виды токсичности (мутагенность, репродуктивная токсичность, аллергизирующее и иммунотоксическое действие)
- специфическая фармакологическая активность
- фармакокинетические исследования

МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВСЕЙ ФАРМЫ

WWW.OLPHARM.RU

Исследования в области микробиологии

- исследование и тестирование чувствительных патогенных микроорганизмов к антимикробным лекарственным средствам
- изучение антимикробного действия лекарственных средств в отношении определенных видов микроорганизмов во избежание неправильной оценки полученных результатов перед испытанием на микробиологическую чистоту и стерильность
- анализ антагонистической активности пробиотических штаммов и препаратов на их основе методом отсроченного антагонизма на плотной среде в чашках Петри



Исследования в области разработки лекарственных средств

- разработка и валидация аналитических методик
- стандартизация НД на лекарственные препараты
- изучение стабильности лекарственных средств
- изучение кинетики растворения
- исследование фармакокинетики в рамках проведения биоэквивалентности
- проведение трансфера методик

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21ФЛ10
от 08.10.2014

Лицензия № 77.01.13.001.Л.000142.04.09
от 30.04.2009 на выполнение работ с
микроорганизмами 3-4 групп патогенности

ООО «ОЛФАРМ»
117105, Г. МОСКВА,
УЛ. НАГАТИНСКАЯ, Д. 3А
ТЕЛ./ФАКС: +7 (499) 611-40-36
E-MAIL: INFO@OLPHARM.RU



LABWARE

**Компания LabWare признанный мировой поставщик
Лабораторных информационных менеджмент систем
с более чем 30-ти летним опытом:**

- Более 1500 компаний и свыше 100 000 пользователей ежедневно работают в ЛИМС LabWare;
- LabWare охватывает 5 континентов и более 130 стран мира.

Основные преимущества продукта LabWare:

- ЛИМС LabWare подходит для любой отрасли вне зависимости от масштаба предприятия и области деятельности лаборатории;
- Полнофункциональный конфигурируемый продукт класса GAMP;
- Полная локализация пользовательского интерфейса;
- Возможность реализации любых задач современной лаборатории при помощи более чем 600 модулей;
- Широкие возможности интеграции со смежными автоматизированными системами и оборудованием любой сложности
- Соответствие как международной, так и отечественной нормативной документации;
- Преемственность и естественная миграция данных при переходе на новые версии.

Выбирая LabWare, Вы можете быть уверены, что получите:

- Лучший продукт на мировом рынке ЛИМС;
- Надежного и ответственного партнера в долгосрочной перспективе;
- Максимальную отдачу и быстрый возврат инвестиций;
- Основанную на передовых технологиях ЛИМС, которая будет расти и развиваться вместе с Вашей компанией.



**На территории России и стран СНГ представлять
компанию LabWare уполномочено ООО "ЛАБВЭА"**

ООО "ЛАБВЭА" г. Москва, тел.: +7 (495) 134 3747, e-mail: info@labware.ru
www.labware.ru www.labware.com