

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ

BAK Scopus®

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

**АВРОРА**
ТЕХНОЛОГИИ ИЗМЕРЕНИЙ

Многофункциональный титратор **CA-310**

Титратор Фишера CA-310 для измерения количества влаги
в твердых и жидких образцах в автоматическом режиме

Стр. 20

ООО «Аврора» официальный представитель **Nittoseiko Analytech** на территории России.

Тел.: +7 (495) 258-83-06**e-mail:** sales@electrochemistry.ru**web:** <https://electrochemistry.ru/>



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-2030)

Основными видами деятельности центра являются:

- биоаналитические исследования (аналитический этап исследований биоэквивалентности, доклинических исследований и 1 фазы клинических исследований) химико-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)



GLP
сертификат



ISO
сертификат



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 21.2427.026 от 21 декабря 2021 г. Сертификат действителен до 5 сентября 2024 г.; международного стандарта ISO 9001:2015 в системе Сертификации Русского Регистра, участника международного форума по аккредитации IAF, сертификат соответствия единого образца IQNet, № Сертификата 21.2428.026 от 21 декабря 2021 г. Сертификат действителен до 5 сентября 2024 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.



РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2022. Том 11, № 1

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2022. Volume 11, No. 1

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 удостоверения.

Первый раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств.

Второй раздел – 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 методик, подготовки регистрационного досье, жизненный цикл лекарственного препарата в ГхР-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.

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

Белобородов В. Л., к. фарм. н., профессор кафедры химии Института фармации им. А. П. Нелюбина Сеченовского университета, 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

Ивкин Д. Ю., к. б. н., доцент, начальник центра экспериментальной фармакологии, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, 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

Куркин В. А., д. фарм. н., профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, 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

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

Оборотова Н. А., проф., д. фарм. н., 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

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

Селезнева А. И., к. м. н., заместитель начальника управления по исследованиям и развитию ФБУ «ГИЛС и НП», Москва, 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

Станишевский 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 Иванэ Джавахишвили, Тбилиси, Грузия

Сысцев 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

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

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.
Основан	Журнал издается с ноября 2012 г.
Периодичность	4 выпуска в год
Префикс DOI	10.33380
ISSN print	2305-2066
ISSN online	2658-5049
Адрес редакции	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Россия, 117246, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3. www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru
Адрес типографии	ООО «МАКС ПРЕСС» Россия, 141092, Московская область, г. Королев, микрорайон Юбилейный, ул. Парковая, д. 2, кв. 103
Копирайт	© Разработка и регистрация лекарственных средств, 2022
Условия распространения материалов	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License 
Тираж	999 экземпляров
Цена	Свободная

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

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 section 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.

Editor-in-Chief

Igor E. Shohin, Dr. of Sci. (Pharm.), CEO in LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC Center of Pharmaceutical Analytics/LLC "CPHA"), Moscow, Russia

Deputy Editor-in-Chief

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

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

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

Editorial board

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

Vladimir L. Beloborodov, Dr. of Sci., Institute of Pharmacy named after A. P. Nelyubina Sechenov University, 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, Retinoidy 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

Dmitry Yu. Ivkin, Cand. of Sci, Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, 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. Kulinich, Cand. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Vladimir A. Kurkin, Dr. of Sci., Samara State Medical University, Samara, 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

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

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

Arina I. Selezneva, Cand. of Sci., State Institute of Drugs and Good Practices, Moscow, 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

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	LC 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	LC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC "CPHA") Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
Publisher	LC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC "CPHA") Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
Journal director	Natalia V. Kuldjanova
Managing Editor	Nadezhda S. Mikhaylova
Founded:	The journal has been published since November 2012.
Frequency	Quarterly
DOI Prefix	10.33380
ISSN print	2305-2066
ISSN online	2658-5049
Editorial office address	LC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC "CPHA") Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru
Printing house address	LLC "MAX PRESS" 2/103, Parkovaya str., Yubileyny microdistrict, Korolev, Moscow region, 141092, Russia
Copyright	© Drug development & registration, 2022
Content distribution terms	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License 
Circulation	999 copies
Price	Free

The journal is included in the List of peer-reviewed scientific publications, in which the main scientific results of dissertations for the degree of candidate of science, for the degree of doctor of sciences should be published

СОДЕРЖАНИЕ

От редакции	10
Поиск и разработка новых лекарственных средств	
Comparative transcriptomic analysis of the malaria parasites <i>Plasmodium falciparum</i> and <i>Plasmodium vivax</i> sensitive and resistant strains	
S. Sakpal, S. Z. Abdeen, Sh. L. Kothari, V. Bastikar	23
Свойства и перспектива применения белка молочной сыворотки лактоферрина в медицине и ветеринарии (обзор)	
Е. Т. Жиликова, О. О. Новиков, А. В. Хмыров, Д. А. Фадеева, В. Э. Гуляева, А. Ю. Малютина, Н. В. Автина	32
Синтез <i>N</i>-ацилфенилацетамидов и <i>N</i>-ацил-β-кетоамидов и их влияние на ЦНС	
И. П. Кодониди, Д. С. Аненко, Д. И. Поздняков	40
Вирус кори как векторная платформа для иммунотерапии опухолей головного мозга (обзор)	
Е. Ю. Николаева, Ю. Р. Щетинина, И. Е. Шохин, В. В. Зверев, О. А. Свитич, О. Ю. Сусова, А. А. Митрофанов, Ю. И. Аммура	51
Фармацевтическая технология	
Перенос технологии косметического эмульсионного крема с лабораторной на пилотную фазу	
М. А. Буракова, О. Н. Абросимова, Ю. М. Ладутько, И. Е. Смехова	59
Разработка гранул целекоксиба для получения капсул и таблеток пролонгированного высвобождения	
А. Алходри, С. Н. Суслина	68
Разработка шипучих гранул с твердой дисперсией фуразолидона	
А. О. Елагина, А. В. Беляцкая, И. И. Краснюк (мл.), И. И. Краснюк, О. И. Степанова, А. Н. Воробьев, Т. В. Фатеева	75
Определение оптимальных технологических условий процесса получения липосомальной лекарственной формы цифетрилина	
М. В. Дмитриева, О. Л. Орлова, А. В. Ланцова, И. И. Краснюк	82
Методы анализа лекарственных средств	
Количественное определение ивермектина в составе полимерных микрочастиц	
А. И. Могайбо, А. В. Мелешко, В. В. Суслов, О. И. Рыбченко, Ю. М. Домнина, С. А. Кедик	90
Растровая электронная микроскопия в анализе видов рода <i>Persicaria</i> Mill.	
А. А. Гудкова, А. С. Чистякова, Д. А. Синицкая, А. И. Сливкин, А. С. Болгов, М. А. Болгова	99
Определение примесей в перспективных антиоксидантах бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфиде и додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфиде	
Т. Г. Шинко, С. В. Терентьева, С. Е. Ягунов, Н. В. Кандалинцева, О. И. Просенко, Е. А. Ивановская, П. И. Пинко	106
Регрессионный анализ в разработке методики выделения и количественного определения водорастворимых полисахаридов из корней подсолнечника однолетнего	
Н. А. Дьякова	113
Изучение морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной методами люминесцентной и стереомикроскопии	
Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, А. А. Гудкова, А. И. Сливкин	123
Анализ элементного состава отдельных видов <i>Sedum (Rhodiola) spp.</i> и <i>Orthilia secunda</i>	
И. И. Тернинко, А. В. Лёзина, Ю. Э. Генералова, М. А. Романова	132

Доклинические и клинические исследования

Изучение фармакокинетики пролонгированного антиаритмического препарата лаппаконитина гидробромида (Аллафорте®, АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия)

О. А. Арчакова, Н. С. Багаева, Т. Н. Комаров, А. В. Рогов, Д. С. Щелгачева,
А. В. Суворова, П. К. Карнакова, П. А. Карпова, И. Е. Шохин 140

Регуляторные вопросы

Системный подход к управлению рисками перекрестной контаминации при производстве лекарственных средств

А. А. Дзержинская, А. А. Спиридонова, Е. Г. Хомутова 149

Процедура взаимного признания при регистрации лекарственных препаратов: новые вызовы или возможности

А. В. Фотеева, О. С. Баршадская, Н. Б. Ростова 159

Организация гигиенического мониторинга загрязненности воздуха рабочей зоны твердыми частицами на фармацевтических предприятиях (обзор)

И. А. Пожарнов, А. С. Симаков, А. А. Шатилина, Г. В. Раменская 165

CONTENTS

Introduction	10
Research and development of new drug products	
Comparative transcriptomic analysis of the malaria parasites <i>Plasmodium falciparum</i> and <i>Plasmodium vivax</i> sensitive and resistant strains S. Sakpal, S. Z. Abdeen, Sh. L. Kothari, V. Bastikar	23
Properties and Prospects of Application of the Whey Protein Lactoferrin in Medicine and Veterinary Medicine (Review) Elena T. Zhilyakova, Oleg O. Novikov, Alexey V. Khmyrov, Darya A. Fadeeva, Valeriya E. Gulyaeva, Anastasiya Yu. Malyutina, Natalya V. Avtina	32
Synthesis and Action of <i>N</i>-acylphenylacetamides and <i>N</i>-acyl-β-ketoamides on the Central Nervous System Ivan P. Kodonidi, Denis S. Anenko, Dmitriy I. Pozdnyakov	40
Measles Virus as a Vector Platform for Glioblastoma Immunotherapy (Review) Eugenia Yu. Nikolaeva, Yulia R. Shchetinina, Igor E. Shokhin, Vitaly V. Zverev, Oxana A. Svitich, Olga Yu. Susova, Alexey A. Mitrofanov, Yulia I. Ammour	51
Pharmaceutical Technology	
Transfer of Cosmetic Emulsion Cream Technology from Laboratory to Pilot Phase Marina A. Burakova, Olesya N. Abrosimova, Yulia M. Ladutko, Irina E. Smekhova	59
Development of Celecoxib Granules for Manufacturing of Prolonged Release Celecoxib Capsules and Tablets Ahmed Alkhodri, Svetlana N. Suslina	68
Development of Effervescent Granules with Solid Dispersion of Furazolidone Anastasiya O. Elagina, Anastasiya V. Beliatskaya, Ivan I. Krasnyuk (Jr.), Ivan I. Krasnyuk, Olga I. Stepanova, Aleksandr N. Vorob'yov, Tatiana V. Fateeva	75
Determination of Optimal Technological Conditions for the Process of Production a Liposomal Dosage Form of Cyphetrylin Maria V. Dmitrieva, Olga L. Orlova, Anna V. Lantsova, Ivan I. Krasnyuk	82
Analytical Methods	
Quantitative Determination of Ivermectin in Polymer Microspheres Anastasiia I. Mogaibo, Anastasiya V. Meleshko, Vasiliy V. Suslov, Oxana I. Rybchenko, Yuliya M. Domnina, Stanislav A. Kedik	90
Scanning Electron Microscopy in the Analysis of Species of the Genus <i>Persicaria</i> Mill. Alevtina A. Gudkova, Anna S. Chistyakova, Daria A. Sinetskaya, Alexey I. Slivkin, Alexey S. Bolgov, Marina A. Bolgova	99
Determination of Impurities in New Promising Antioxidants Bis-[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propyl]sulfide and Dodecyl(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl)sulfide Tatiana G. Shinko, Svetlana V. Terentyeva, Semen Ye. Yagunov, Natalya V. Kandalintseva, Olga I. Prosenko, Yelena A. Ivanovskaya, Pavel I. Pinko	106
Regression Analysis in Development of Method for Isolation and Quantitative Determination of Water-soluble Polysaccharides from Sunflower Roots of One-year-old Nina A. Dyakova	113
Study of Morphological Features of Sea Buckthorn Leaves by Luminescent and Stereomicroscopy Methods Natalia A. Kovaleva, Olga V. Trineeva, Alevtina A. Gudkova, Alexey I. Slivkin	123

Analysis of the Elemental Composition of Individual Species *Sedum (Rhodiola) spp.* and *Orthilia secunda*

Inna I. Terninko, Alyona V. Lezina, Yulia E. Generalova, Margarita A. Romanova 132

Preclinical and clinical study

Pharmacokinetics Study of the Long-acting Antiarrhythmic Drug of Lappaconitine Hydrobromide (Allaforte®, JSC "Pharmcenter VILAR", Russia)

Olga A. Archakova, Natalia S. Bagaeva, Timofey N. Komarov, Anton V. Rogov,
Dana S. Shchelgacheva, Alexandra V. Suvorova, Polina K. Karnakova, Polina A. Karpova,
Igor E. Shohin 140

Regulatory Issues

Systematic approach to cross-contamination risk management in the production of medicinal products

Anna A. Dzerzhinskaya, Alexandra A. Spiridonova, Elena G. Khomutova 149

Mutual Recognition Procedure for the Registration of Medicines: New Challenges or Opportunities

Alexandra V. Foteeva, Olga S. Barshadskaya, Natalya B. Rostov 159

Organization of Hygienic Monitoring of Working Area Air Pollution by Particulates in Pharmaceutical Industries (Review)

Igor A. Pozharnov, Alexey S. Simakov, Anastasia A. Shatilina, Galina V. Ramenskaya 165

Редакционная статья / Editorial article

Ежегодная конференция с международным участием «Разработка и регистрация лекарственных средств: применение правил GLP ЕАЭС» состоялась 17 декабря 2021 года

Научно-практическая конференция «Разработка и регистрация лекарственных средств: применение правил GLP ЕАЭС» прошла в онлайн-формате 17 декабря 2021. Организаторами конференции выступили ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» и научно-производственный журнал «Разработка и Регистрация лекарственных средств». Мероприятие было организовано при поддержке коллег из Статэндокс Академии.

Annual Conference with International Participation "Drug Development and Registration: Application of the EAEU GLP Rules" Took Place on December 17, 2021

The scientific and practical conference "Drug development and registration: Application of GLP Rules of the EAEU" was held online on December 17, 2021. The conference was organized by LLC "CPHA" and the research and production journal "Drug development and registration". The event was organized with the support of colleagues from Statandocs Academy.

В рамках конференции были освещены вопросы применения принципов GLP в соответствии с требованиями ЕАЭС при проведении исследований лекарственных средств.

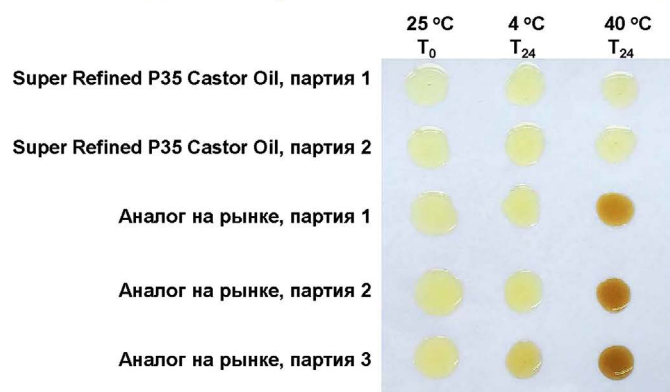
Открывал мероприятие доклад директора научно-производственного журнала «Разработка и регистрация ЛС» **Наталии Вячеславовны Кульджановой**. В рамках своего доклада **Наталья Вячеславовна** поделилась информацией об издании, произошедших переменах, планами развития журнала, а также возможными форматами партнерского взаимодействия с изданием.

Научная программа мероприятия состояла из нескольких секций. В рамках секции «Презентация нового оборудования и готовых решений» **Олеся Ве-**

рещагина (ООО «Крода РУС») рассказала о влиянии качества вспомогательных веществ на профиль растворимости и биоэквивалентность.

В докладе были рассмотрены примеры современных жидких ЛС в капсульной форме, показаны исследования стабильности часто используемых вспомогательных веществ и указаны критические точки контроля качества. Материал доклада особенно актуален компаниям-разработчикам и производителям инновационных ЛС в форме микроэмульсий, а также тем, кто работает со сложными чувствительными и нестабильными АФИ. Было продемонстрировано, что ряд примесей, содержащихся во вспомогательных веществах, провоцирует сшивку желатина и как следствие – несоответствие растворимости капсулы

Визуально видимое разложение – 24 недели



нормам теста на растворение и скорости высвобождения АФИ, а также деградацию самого активного компонента. Как вариант решения описанных проблем предложены Super Refined / суперочищенные вспомогательные вещества.

Антон Екимов (компания Gluvex) в своем докладе познакомил слушателей с полностью автоматической системой растворения SOTAX AT MD и преимуществами автоматического тестирования при исследовании кинетики растворения.



Полностью автоматизированная настольная система растворения AT MD поддерживает проведение теста «Растворение» по методам USP 1 (вращающаяся корзинка), USP 2 (лопастная мешалка) с возможностью задействовать в этом процессе грузила (в т. ч. грузила японского типа) для предотвращения всплывания капсул на поверхность среды растворения. Программное обеспечение SOTAX AT MD полностью соответствует 21 CFR, часть 11.

Почему автоматическое тестирование?

- *Повышение достоверности данных.*

Каждый тест растворения проводится в одинаковых условиях, благодаря точной настройке параметров. Каждый шаг фиксируется в памяти прибора и ПО, исключая ошибки ввода данных. Результаты тестов не зависят от оператора.

- *Повышение продуктивности.*

Автоматическое тестирование растворения повышает продуктивность работы, освобождая больше времени для разработки метода, валидации процесса, проверки данных и поверки оборудования. Результат: сокращение циклов обработки и выполнение большего объема работы с помощью имеющихся в распоряжении заказчика ресурсов.

- *Сокращение временного цикла.*

Применение лабораторной автоматизации помогает многим компаниям оставаться конкурентоспособными. С помощью автоматизации как R&D отделы, так и отделы контроля качества, некоторых компаний организуют непрерывный процесс, что позволяет сократить срок вывода нового продукта на рынок.

- *Сокращение количества ошибочных результатов.*

Автоматическое тестирование растворения минимизирует влияние человеческого фактора и упрощает процедуру исследования.

Михаил Чистяков (специалист по оборудованию Oxford Instruments, ООО «АВРОРА») поделился опытом применения настольного широкополосного ЯМР-спектрометра X-Pulse в фармацевтической практике.



Явление ядерного магнитного резонанса (ЯМР) связано с наличием у ядер определенных изотопов элементов не нулевого магнитного момента, в связи с чем, при попадании во внешнее постоянное магнитное поле происходит дискриминация ядер изотопа по дискретным энергетическим состояниям, между которыми возможен переход посредством поглощения электромагнитного импульса. С момента открытия явления ЯМР прошло уже более 70 лет. За это время из простого явления ЯМР превратился в мощный физико-химический метод анализа, который применяется во многих областях промышленности, в том числе и фармацевтике, где существуют отдельные фармацевтические статьи ОФС.1.2.1.1.0007.15 и ОФС.1.7.2.0014.15, в которых метод ЯМР рекомендован для установления подлинности, идентификации и количественного определения действующего вещества, посторонних примесей и остаточных органических растворителей. Первые ЯМР-спектрометры были оснащены постоянными магнитами от 40 до 90 МГц. В современной практике используются преимущественно приборы со сверхпроводящими магнитами от

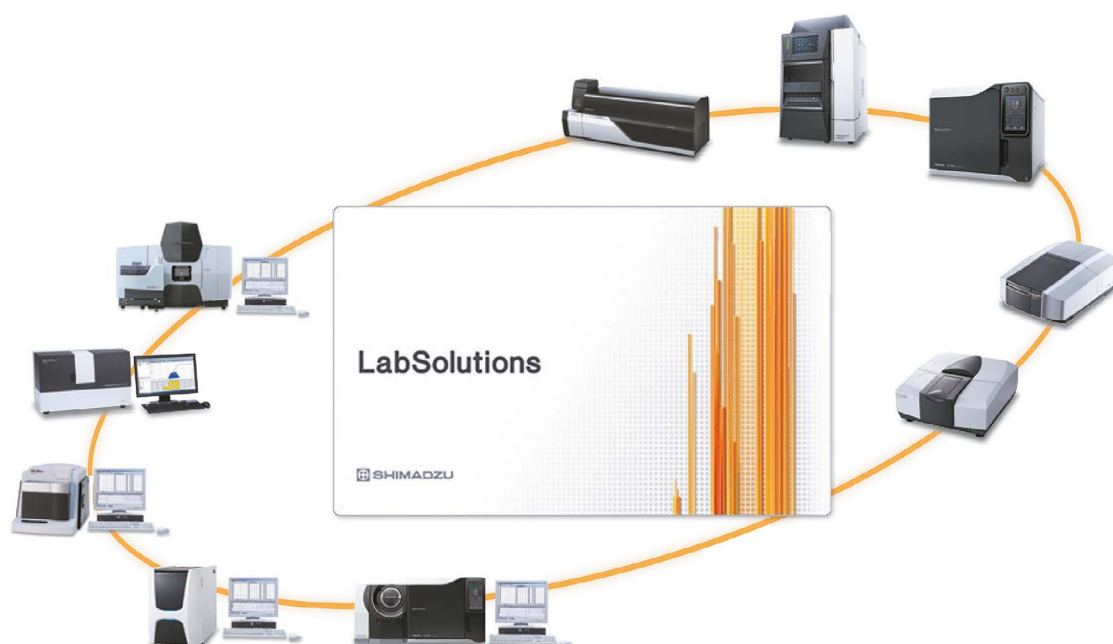
400 до 1000 МГц, что позволяет достигать высокого разрешения и чувствительности, и значительно расширяет возможности метода. Использование современных систем требует высоких затрат на обслуживание и специалистов высокой квалификации, что порой просто не доступно для обыкновенной синтетической лаборатории. С начала XXI века бурно развивается направление настольных компактных ЯМР-спектрометров с постоянными редкоземельными магнитами, не требующими криогенного охлаждения и высокой подготовки специалистов для работы и обслуживания. Наблюдается своего рода «ренессанс» в ЯМР-спектроскопии. ЯМР-спектрометры стали таким же доступным оборудованием, как обычные ИК-спектрометры, однако они могли проводить эксперименты не более, чем на 3-х ядрах. В 2019 году компанией Oxford Instruments был анонсирован первый в мире широкополосный многоядерный настольный ЯМР-спектрометр X-Pulse. Спектрометр является трехканальным. Один канал для лок-сигнала, настроенный на частоту дейтерия, второй – для сигналов протона и фтора, третий – для других ядер, часто называемых X-ядрами. X-канал может анализировать ядра с частотой Лармора от 11 до 25 МГц при напряженности поля 1,4 Тл. Таким образом, один настольный прибор позволяет проводить ЯМР-эксперименты на ядрах: ^1H , ^{19}F , ^{13}C , ^{31}P , ^{11}B , ^{29}Si , ^7Li , ^{23}Na , ^{59}Co , ^{27}Al , что существенно расширяет аналитические возможности для пользователя. Часто бывают задачи, где для идентификации или расшифровки структуры молекул недостаточно спектров только лишь на ядрах ^1H и ^{13}C , а гораздо больше информации можно получить в результате экспериментов на других ядрах. Прибор обладает

высокой долговременной стабильностью, хорошим разрешением и чувствительностью. Имеет необходимые предустановленные импульсные последовательности для проведения одномерных и двумерных экспериментов на всех доступных ядрах. Пользователь может также самостоятельно создавать собственные последовательности и эксперименты. X-Pulse может быть с успехом использован не только для работы согласно ОФС.1.2.1.1.0007.15 и ОФС.1.7.2.0014.15, но и для изучения строения фарм-субстанций, исследования кинетики реакций и процессов массопереноса. X-Pulse – это надежный и доступный инструмент с широкими возможностями для осуществления ЯМР-экспериментов в любой фармацевтической лаборатории.

В рамках секции GLP в исследованиях лекарственных средств **Татьяна Борисова** (Shimadzu) рассказала о сетевом программном обеспечении LabSolutions DB/CS – концепция Shimadzu для сбора, обработки, управления и хранения аналитических данных, которая удовлетворяет требованиям надлежащих практик GMP/GLP.

В последнее время ужесточились требования к безопасности фармацевтических препаратов в связи с увеличившимися случаями несоответствия целостности данных, первые упоминания о которых были в предупредительных письмах FDA еще в 2017 году. Основная причина заключалась в неполноте предоставляемых данных.

Фармацевтический рынок – это прежде всего здоровье и безопасность населения, поэтому предприятия обязаны обеспечить соответствие регуляторным требованиям и компетентным рекомендациям (например, рекомендациям FDA по работе с



электронными подписями и электронными записями и т. д.), а также должны организовать правильное и эффективное управление оборудованием и аналитическими данными.

Компания Shimadzu предлагает семейство программного обеспечения (далее ПО) для аналитических лабораторий, построенного на единой платформе LabSolutions, которое позволит полностью автоматизировать деятельность лабораторий и обеспечить выполнение требований ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» в части обеспечения целостности данных компьютеризированных систем на протяжении всего жизненного цикла данных.

Программное обеспечение LabSolutions DB (Data-Base) – это автономная программа, которая объединяет функции хранения данных в базе Microsoft SQL Server Express и управления данными инструментальным ПО LabSolutions. LabSolutions DB соответствует требованиям электронных записей/электронных подписей (ER/ES) и рекомендуется для лабораторий с парком оборудования до 10 единиц.

Сетевое ПО LabSolutions CS (client server) подключает приборы Shimadzu в сеть, управляемую единым сервером, который предоставляет доступ многим пользователям. В дополнение LabSolutions CS также может управлять хроматографическими приборами сторонних производителей (Agilent Technologies, Thermo Fisher Scientific). Работа с приборами возможна как с клиентских ПК в сети LabSolutions CS, так и с удаленных тонких клиентов терминального сервера. Рекомендуется для лабораторий, оборудованных множеством приборов, в т. ч. находящихся в разных помещениях, зданиях или городах.

Заключительная секция была посвящена биофармацевтическим исследованиям лекарственных средств.

Фишер Елизавета Николаевна, к. фарм. н., заведующий ЛФР ООО «ЦФА» представила доклад на тему «Установление *in vitro* – *in vivo* корреляции при разработке ЛС с модифицированным высвобождением».

В презентации был рассмотрен кейс установления IVIVC уровня C для пролонгированного инъекционного препарата пептидной природы, описано проведение биоаналитического этапа, *in vitro* этапа изучения высвобождения, статистической обработки данных.

Тимофей Николаевич Комаров, заведующий лабораторией биоаналитических исследований № 2 ООО «ЦФА», выступил с обновлённым докладом на тему «Надлежащая и ненадлежащая практика при исследованиях биоэквивалентности». В докладе были представлены примеры из реальной практики, иллюстрирующие ошибки, приводящие к искажению результатов исследований биоэквивалентности, такие как ошибки на стадии планирования эксперимента: некорректный выбор биологической матрицы, выбор аналитического оборудования, недостоверные и противоречащие друг другу данные научных публикаций по теме исследования, ошибки клинического центра: неправильное дозирование, нарушение процедуры отбора биообразцов и их хранения, пренебрежение аналитиком-хроматографом принципами хроматографического разделения и применение так называемой мертвообъёмной хроматографии, приводящей к получению ложных результатов, нарушение процедур пробоподготовки.

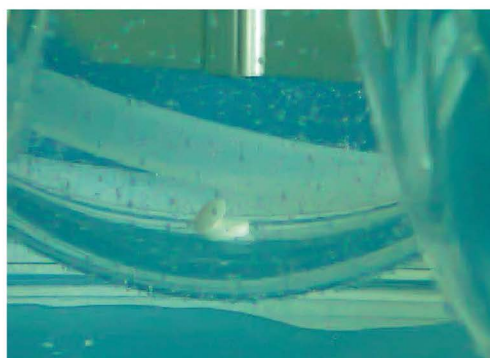
Завершилась секция докладом генерального директора ООО «ЦФА», д. фарм. н. **Игоря Евгеньевича Шохина** на тему «ТСКР препаратов с модифицированным высвобождением: особенности проведения и основные ошибки». Докладчиком была отмечена особая важность *in vitro* изучения высвобождения препаратов с модифицированным высвобождением в свете реализации требований Приложения 10 к Решению № 85 ЕЭС (Руководство по фармакокинетическому и клиническому изучению биоэквивалентности лекарственных препаратов с модифицированным высвобождением).

Мероприятие собрало почти 600 слушателей. Среди посетителей конференции – специалисты и руководители отделов контроля и обеспечения качества, специалисты по ДКИ, КИ, отделов регистрации,

ТСКР препаратов с отложенным высвобождением: кислотная стадия



Референтный препарат



Исследуемый препарат

сотрудники аналитических лабораторий, технологи, инженеры, а также топ-менеджмент фармацевтических компаний. Слушателям представилась возможность принять участие в обсуждении докладов и задавать вопросы лекторам по ходу их выступления.

Посмотреть запись мероприятия можно, перейдя по ссылке:



О конференции:

Ежегодная научно-практическая конференция «Разработка и регистрация лекарственных средств» проводится 2 раза в год: июнь, декабрь. Организато-

рами конференции выступают ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» и научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств». Целью мероприятия является обсуждение актуальных вопросов, связанных с разработкой, исследованиями, а также регистрацией ЛС. **По вопросу участия в дальнейших мероприятиях как в качестве слушателя, так и в качестве докладчика просьба обращаться к организаторам info@pharmjournal.ru.**

Для получения актуальной информации о предстоящих мероприятиях подпишитесь на рассылку журнала.



УДК 615.11

Редакционная статья / Editorial article

Возрождение химической промышленности России в советский период (1917–1927 гг.). Часть 1

К. С. Гузев*

АО «Ретиноиды», 143989, Россия, Московская обл., мкр. Керамик, г. Балашиха, ул. Свободы, д. 1А, оф. 404

*Контактное лицо: Гузев Константин Сергеевич. E-mail: guzev3@yandex.ru

Резюме

В работе, на примере воспоминаний профессора В. Н. Ипатьева, кратко представлена история возрождения химической промышленности молодой Советской республики в период с 1917 по 1927 гг. В первой части статьи описаны первые шаги Советской власти по восстановлению отечественной химической промышленности. Осознав важность химической промышленности, как составной части оборонного комплекса государства, правительство РСФСР приступило к последовательному восстановлению предприятий, разрушенных во время двух революций и гражданской войны. С организацией ВСНХ и отдела химической промышленности начинаются планомерные посещения предприятий химической промышленности с целью их обследования, переоборудования и запуска. Все это происходило в тяжелейших условиях продолжающейся гражданской войны и всеобщей разрухи. Кратко описана национализация мелких и крупных предприятий, а также организация Государственного института научно-технических исследований (ГОНТИ), специализированного издательства, различных химических кооперативов.

Revival of the Russian chemical industry during the Soviet period (1917–1927). Part 1

Konstantin S. Guzev*

JSC «Retinoids», off. 404, 1A, Svobody str., Balashikha, Ceramic microdistrict, Moscow Region, 143983, Russia

*Corresponding author: Darya A. Fadeeva. E-mail: guzev3@yandex.ru

Abstract

In the work, on the example of the memoirs of Professor VN Ipatiev, the history of the revival of the chemical industry of the young Soviet Republic in the period from 1917 to 1927 is briefly presented. The first part of the article describes the first steps of the Soviet government to restore the domestic chemical industry. Realizing the importance of the chemical industry as an integral part of the state's defense complex, the government of the RSFSR began the consistent restoration of enterprises destroyed during the two revolutions and the civil war. With the organization of the Supreme Council of National Economy and the department of the chemical industry, systematic visits to chemical industry enterprises began with the aim of inspecting, re-equipping and launching them. All this happened in the most difficult conditions of the ongoing civil war and general devastation. The nationalization of small and large enterprises is briefly described, as well as the organization of the State Institute of Scientific and Technical Research (GONTI), a specialized publishing house, and various chemical cooperatives.

При Временном правительстве отраслевые заводы, с таким трудом построенные и запущенные во время Первой мировой войны, работу прекратили, так как не было ни сырья, ни рабочих. Процесс возрождения отечественной химической, а затем и фармацевтической промышленности после прихода к власти большевиков в доступной литературе освещен, на наш взгляд, недостаточно, что и обусловило выбор темы настоящего исследования.

Цель работы заключалась в представлении читателю материала, характеризующего трудный и длительный процесс восстановления химической промышленности в Советской России.

Для выполнения поставленной задачи можно было проработать большое количество печатных источников и на основании изложенных в них све-

дений составить картину состояния российской химической промышленности после Первой мировой войны, при Временном правительстве и после Октябрьского переворота. Однако при чтении этих работ создалось впечатление, что они не в должной степени отражают истинное положение вещей, так как критическое состояние отрасли в тот период искусно ретушировалось. Мы выбрали другой путь, показавшийся нам более целесообразным. Источником достоверной и объективной информации нам послужила монография **Владимира Николаевича Ипатьева** – профессора химии, эмигрировавшего в 1930 г. в Америку. Заслуги этого крупного ученого, успешного организатора и истинного русского патриота трудно переоценить. Его книга состоит из двух томов и

© Гузев К. С., 2022

© Guzev K. S., 2022

носит название «Жизнь одного химика. Воспоминания»¹. Этот труд увидел свет в Америке в 1945 г., в СССР он не издавался, по причине того, что автор эмигрировал и за этот поступок был заочно репрессирован, лишен всех государственных наград и ученых званий. Несмотря на это, **В. Н. Ипатьев** в своей книге с большой теплотой вспоминает коллег, с которыми он восстанавливал и отстраивал заново химические заводы послереволюционной России и Советского Союза. Мемуары представляют собой воспоминания ученого и практика, который лично принимал участие в этом деле; в них **В. Н. Ипатьев** высказывает свое независимое мнение свободного человека. Изложенные им факты, на наш взгляд, не подлежат сомнению, так как он пишет только о том, свидетелем и участником чего был лично. Представленные автором суждения и характеристики людей, с которыми ему приходилось работать, объективны, так как книга вышла за рубежом и не подвергалась какой-либо цензуре. За личными воспоминаниями и критическими суждениями четко проступают шаги, сделанные большевиками по реанимации химической промышленности. Огромное достоинство книги состоит в том, что в ней автор объединил свои воспоминания и структурировал их, выстроив хронологически. Мемуары написаны прекрасным русским языком, читать их очень комфортно и интересно.

При этом мы посчитали неверным описывать состояние российской химической промышленности в исследуемый период, основываясь лишь на воспоминаниях очевидца. Поэтому, личные воспоминания участника событий мы сопроводили сухими текстами декретов, приказов и распоряжений Совета народных комиссаров, Высшего совета народного хозяйства, Народных комиссариатов (внутренних дел, по военным делам, просвещения, здравоохранения) и других руководящих структур молодой советской республики, а также привели некоторые статистические данные, найденные в отчетах департаментов химической промышленности.

Прежде всего, мы сочли необходимым познакомить читателя с личностью **Владимира Николаевича Ипатьева**, человека просвещенного, незаурядного, деятельного.

Он так говорил о себе: «Я совершенно не капиталист, я – ученый, но не лишенный практических навыков, и вдобавок оказался еще неплохим администратором, который в течение 3 лет управлял всей химической промышленностью России во время войны и, как говорят, управлял неплохо». Прочтение книги создает твердое представление, что **В. Н. Ипатьев** – это ученый с мировым именем, непререкаемым авторитетом не только среди отечественных и зарубежных ученых, но и среди большинства владельцев химических концернов в Европе, человек чест-

¹ Ипатьев В. Н. Жизнь одного химика. Воспоминания. Т. 2. 1917–1930 гг. М.: Книга по требованию; 2013. 648 с.



В. Н. Ипатьев (1942 г.). Фото из открытых источников

ный, принципиальный, с незапятнанной репутацией и твердым характером. Преданный химии как науке, будучи организатором химической промышленности в России во время Первой мировой войны, он пользовался большим уважением у представителей администрации химических предприятий, у инженеров-химиков, лаборантов и рабочих на всех отечественных отраслевых заводах. Он имел звание генерала и, несмотря на свою аполитичность, был знаком с Государем-императором, членами правительства и генералитетом. После Октябрьского переворота **В. Н. Ипатьев** входил в государственные структуры (фактически был членом правительства большевиков) и был лично знаком с **В. И. Лениным**, **Л. Д. Троцким**, **Ф. Э. Дзержинским**, **Ю. Л. Пятаковым** и другими членами правительства Советской России. Оценивая заслуги **В. Н. Ипатьева** перед страной, можно с твердой уверенностью сказать, что этот человек дважды совершил подвиг во имя России. Сначала он создал отлично функционирующую химическую промышленность в тяжелейший для России период Первой мировой войны, а затем воссоздал ее же после событий 1917 года.

ПЕРВЫЕ ШАГИ ПО ВОССТАНОВЛЕНИЮ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

К началу 1917 г. **В. Н. Ипатьев** продолжал руководить Химическим комитетом при Главном Артиллерийском Управлении (ГАУ) и состоял членом Академии наук России (он был самым молодым академиком). Именно эти две организации и определили дальнейшую судьбу химической промышленности Советской России. Ситуация в них была очень трудной. По воспоминаниям **В. Н. Ипатьева**, деятельность этих

структур в то время почти совсем замерла, но заседания, на которых академики, в основном, обменивались новостями и слухами, продолжались. Вскоре после Октябрьской революции в Химический комитет был назначен большевистский комиссар **Т. Слободский** из Комиссариата внешней торговли. Давая характеристику этому человеку, **В. Н. Ипатьев** пишет, что «он не был настойчив в своих взглядах, ничего не понимал в нашем деле и ничем не интересовался». Весной 1917 г. он был командирован в Германию, вероятно, для налаживания предварительных связей с ее химическими концернами, где вскоре был убит при невыясненных обстоятельствах.

Первое упоминание об интересе правительства большевиков к химической промышленности относится к ноябрю 1917 г. **В. Н. Ипатьев** вспоминает: «В конце 1917 г. ко мне явился мой знакомый **Н. А. Коллодкин**, который еще до войны обращался ко мне за советом относительно постройки завода бертолетовой соли для снабжения ею наших спичечных фабрик. Он сообщил, что меня хочет видеть инженер-химик **Л. Я. Карпов**, большевик, который теперь занимает по поручению **Ленина**, пост начальника всей химической промышленности в России. При встрече **Л. Я. Карпов** сообщил мне, что знает хорошо всю мою деятельность во время войны и теперь обращается ко мне с просьбой от имени правительства помочь организовать совместную работу для перехода военно-химической промышленности на мирное положение». На это я ответил: «Что касается меня, то я готов сделать все от меня зависящее, чтобы спасти созданную нами во время войны химическую промышленность».

Судя по всему, эта встреча состоялась в декабре 1917 г. сразу после опубликования декрета об организации Высшего совета народного хозяйства (ВСНХ) [Приложение I].

Через полгода после этого Химический комитет при ГАУ был расформирован Постановлением ВСНХ, а его кадры перераспределены [Приложение II]. Этому решению предшествовало совещание, организованное **В. Н. Ипатьевым**. Он вспоминает: «Совещание было организовано в январе 1918 г. На него, кроме членов Химического комитета, были приглашены многие профессора химии, принимавшие активное участие в химической обороне. После активного обмена мнениями, продолжительных прений и больших споров было решено после расформирования Химического комитета в июле 1918 г. часть сотрудников направить в Артиллерийский комитет ГАУ, а другую его часть перевести на работу в Химический отдел ВСНХ, под начальство **Л. Я. Карпова**». Большинство голосов **В. Н. Ипатьев** был рекомендован к назначению председателем Особой комиссии при Отделе химической промышленности ВСНХ для мобилизации химической промышленности.

В соответствии с требованиями нового правительства в Отделе химической промышленности ВСНХ учреждался Совет из 15–20 человек, который и дол-

жен был решать все вопросы. В него вошли вновь назначенные начальники военных химических заводов или председатели заводских комитетов – по большей части большевики и левые эсеры. Кроме начальников в Совет входили представители рабочих от всех химических заводов и два делегата от военных инженеров. Совету было поручено наладить работу химических предприятий России.

В марте 1918 г. состоялось Особое совещание по обороне. **В. Н. Ипатьев** был приглашен на это совещание. После обсуждения общих вопросов было решено организовать Военный совет. **В. Н. Ипатьев** решением правительства был назначен председателем Технического управления. В его обязанности входила подготовка вопросов для обсуждения на Военном совете. 1 апреля Военный совет переехал в Москву, и **В. Н. Ипатьев**, после консультации с **Л. Я. Карповым**, покинул этот пост, сконцентрировавшись на работе в Химическом отделе ВСНХ.

Летом 1918 г. началась национализация крупных и средних промышленных предприятий России. Этот процесс протекал довольно сложно. По большей части владельцы и директора большинства химических предприятий уже покинули территорию России, ведь большинство хозяев были немцами, ставшими нашими противниками в Первой мировой войне. После революции Россию стали покидать отечественные промышленники, предприниматели, ведущие инженеры и некоторые ученые. Национализация заводов и фабрик проходила на основании издания особых декретов и постановлений. Одним постановлением могли быть национализированы как отдельные, особо крупные и важные для страны, заводы и фабрики, так и целые отрасли промышленности [Приложения III, IV, V].

Вот так, на основании одного документа и трех подписей на нем, владельцы предприятий, вложившие в них не столько капиталы, сколько душу, энергию и энтузиазм, лишались их и становились «врагами революции».

Вспоминает **В. Н. Ипатьев**: «К концу 1918 г. жизнь в Петрограде стала очень тяжелой. Продукты и дрова закончились и практически не подвозились. Город пустел, продовольственный кризис обострялся. Жизнь в Академии наук и Артиллерийской академии чуть теплилась. Химические лаборатории ГАУ перестали функционировать. Насколько ужасно было положение с продовольствием, можно судить по тому, что из 45 членов Академии наук между 1918–1919 гг. умерло семь. **А. М. Горький** первый обратил внимание **В. И. Ленина** на это, сказав, что при такой ситуации никакого прогресса в стране не будет и надо срочно принять определенные меры. Для сохранения этой малочисленной группы населения от вымирания (40 академиков) с начала 1919 г. им стали выдавать ежемесячно паек: 45 фунтов хлеба, два фунта крупы, два фунта сахара, один фунт масла и немного других продуктов. Уже через месяц правительство постановило выдавать ежемесячно паек всем заре-

гистрированным ученым, имеющим печатные работы. Паек, кроме уже перечисленных продуктов, содержал еще мясо и небольшое количество жиров. В дальнейшем ученые, на основании их заслуг, были разбиты на пять групп, причем в пятую, высшую, группу вошли только ученые с мировым именем и, кроме продовольствия, им выделялись денежные средства в золотой валюте. Кроме того, некоторым ученым предоставлялась возможность немного отдохнуть и полечиться в специально организованных санаториях».

Весь 1919 г. жизнь в Петрограде осложнялась еще и критическим положением Красной армии на фронтах (противостояние белогвардейским отрядам князя Бермондт-Авалова, войскам Юденича и Деникина). Несмотря на это, в Петрограде был образован Институт по экономическим исследованиям РСФСР. В его состав входили люди, которые в прежнее время принимали участие в жизни различных отраслей промышленности и экономики России. **В. Н. Ипатьев** был приглашен в химическую секцию этого института.

Первая серьезная деловая командировка **В. Н. Ипатьева** по проверке состояния химических предприятий состоялась в конце 1919 г. Он получил предложение отправиться в Казань для обследования и ревизии мыловаренного и свечного заводов братьев Крестовниковых. В 1919 г. вся промышленность управлялась при помощи Главков, которые объединяли в себе все профильные предприятия. В состав Главжира входили масляные, мыловаренные и свечные заводы. Поэтому на время командировки к **В. Н. Ипатьеву** был прикреплен специалист по отверждению жиров (инженер Е. К. Машкилейсон), еще до войны занимавшийся этой проблемой. Несмотря на сложности с дорогой из Москвы в Казань и обратно, а также с питанием и проживанием, **В. Н. Ипатьев** подробно осмотрел процесс переработки жиров и оборудование, которое было сохранено на заводе. После разговора с персоналом заводууправления, состоящим, в основном, из старых служащих, он пришел к выводу, что предприятие находится в удовлетворительном состоянии и может выдавать приличную по качеству продукцию. Об этом он сообщил в Центрожире в Москве. С того времени **В. Н. Ипатьев** стал регулярно получать предложения по обследованию как военных, так и гражданских химических предприятий.

В начале 1919 г. декретом Совнаркома Центральной научно-технической лаборатории Военного ведомства была передана в ведение Научно-технического отдела ВСНХ. Через год, в начале мая 1920 г., было проведено обследование Центральной химической лаборатории ГАУ и Опытного химического завода на Ватном острове (Петроград) [Приложение VI]. Обследование проводила группа, состоящая из председателя и членов химического отдела ВСНХ – **Л. Я. Карпова, Б. И. Збарского, В. Певреверзева и В. Н. Ипатьева**. По воспоминаниям

В. Н. Ипатьева, после обсуждения результатов проверки на соответствующей комиссии ВСНХ было предложено назвать лабораторию Государственным Институтом научно-технических исследований (ГОНТИ), а **В. Н. Ипатьева** назначить его директором. В институте были организованы следующие отделы: неорганический, органический, пороховой, взрывчатых веществ, пищевой, интендантский, электротехнический, воздухоплавательный, двигательный.

В. Н. Ипатьев вспоминает, что работа пищевого отдела иногда спасала от голода весь институт. Так, в этот отдел обратился уполномоченный комиссариата продовольствия с просьбой предложить наилучший тип жестянок для консервов, а также выяснить влияние различных масел и жиров на стенки консервных банок. Для исследования были затребованы необходимые количества жиров и готовых продуктов для консервации, которые в дальнейшем частично были розданы сотрудникам отделов Института. В другой раз военный комиссар **Л. Д. Троцкий** обратился в Институт с предложением создать курсы военных кашеваров, которые могли бы научиться готовить вкусную и питательную пищу в полевых условиях. Такие курсы были организованы и 50 поваров были подготовлены. Благодаря практическим занятиям сотрудники Института иногда получали некоторое количество готовых блюд.

В. Н. Ипатьеву был памятен еще один случай. Петроградский Совет народного хозяйства поручил ему организовать очистку фарватера рек – Большой и Малой Невки – от разрушенных барж, мешающих проходу по ним судов. **В. Н. Ипатьев** пригласил для этой работы четырех сотрудников лаборатории взрывчатых веществ, которые и выполнили эту работу. Они изготовили тротильные заряды, заложили их в нужные места барж (благо, что и тротила, и специалистов-взрывников в институтской лаборатории было достаточно), и задание было выполнено. За эту работу они получили пайки за три месяца, а также набрали рыбы, которая была оглушена взрывами. **В. И. Ипатьев** пишет: «Конечно, кроме нас рыбу собирало все население набережных рек». Аналогичным способом эта группа специалистов принимала участие в валке леса с помощью тротила. Вот так выживали профессора и инженеры.

В 1919 г. дошла очередь и до национализации крупных заводов химической промышленности. В марте публикуется Постановление ВСНХ «О национализации основной химической промышленности и об утверждении Центрального правления государственных заводов основной химической промышленности» [Приложение VII]. В результате этого мероприятия были одним махом национализированы три завода в северном районе России, 24 предприятия в центральном районе, четыре производства в Верхневолжском районе и два вспомогательных предприятия, специализирующихся на производстве огнеупорных изделий – посуды и кирпича. Чуть

позже национализировали склады, торгующие химическими продуктами [Приложение VII]. Таким образом, уже в этом году все предприятия химической промышленности царской России были полностью национализированы.

Весной 1920 г. на заседании президиума ВСНХ были обсуждены вопросы восстановления коксобензольных и суперфосфатных заводов. По результатам доклада **В. Н. Ипатьева** и горячего обсуждения проблемы восстановления заводов, было принято постановление о создании специальной комиссии, задача которой состояла в обследовании этих заводов и изыскании средств для их полного восстановления.

Начиная с 1920 г. **В. И. Ипатьев**, работая в Петроградском Совете народного хозяйства, многократно привлекался к проведению инспекций практически на всех химических предприятиях города и области, включая даже резиновое производство – завод «Треугольник».

В начале мая 1921 г. **В. Н. Ипатьев** был назначен **В. И. Лениным** членом вновь учрежденной Плановой Комиссии, в задачи которой входила работа по восстановлению всей государственной промышленности. Позднее эта Комиссия была переименована в ГОСПЛАН.

В созданную структуру вошли 35 членов и консультантов по всем отраслям техники и энергетики. Госплан разделили на несколько секций, которые детально рассматривали все вопросы по планирова-

нию промышленности. Окончательное решение выносил президиум Госплана, состоящий из нескольких членов, назначенных лично **В. И. Лениным**.

Важно отметить, что еще в 1918 г. при научно-техническом отделе ВСНХ было создано Научное химико-технологическое издательство, которое осуществляло печатание научных работ в виде отдельных книг и брошюр. Выпускались также учебники (в частности, по органической химии) и учебные пособия. Работа издательства была ориентирована на культурные и просветительские цели, служила распространению и развитию химических знаний. Кроме этого издательства, успешно работало и техническое издательство, которое выпускало книги, освещающие разные области техники.

В декабре 1920 г. государственные органы разрешили создать кооперативное химическое общество, названное впоследствии «Кооперахимия», предназначенное для производства различных химикатов, а также химических реактивов для научных и технических лабораторий. В состав его членов входили рядовые химики, рабочие, инженеры-технологи действующих предприятий, а также – известные ученые и другие специалисты химической отрасли. Несмотря на давление, которое испытывало это общество со стороны государства, оно все же выполняло поставленные перед ним задачи и просуществовало до 1930 г.

Многофункциональный титратор CA-310

Авторы подготовили статью на финансовой поддержке компании ООО «АВРОРА»

Новый CA-310 представляет собой трансформируемый титратор Карла Фишера, который можно легко переключить с кулонометрического измерения на объемное или наоборот, что позволит определить содержание воды от 1 ppm до 100 %.

CA-310 High Spec & Performance Karl Fischer Moisture Meter

The authors prepared the article with the financial support of LLC "AVRORA"

The new CA-310 is a convertible Karl Fischer titrator that can be easily switched from coulometric to volumetric measurement or vice versa, which allow to determine the water content from 1 ppm to 100 %.

ОДИН ПРИБОР – ДВА МЕТОДА

Определение воды в образце – один из наиболее распространенных лабораторных анализов. Одним из основных является метод Карла Фишера, который обладает высокой точностью, воспроизводимостью результатов, селективностью по воде. Его можно валидировать и полностью задокументировать.

Компания Nittoseiko Analytech (Япония) представляет титратор Фишера CA-310 для измерения количества воды (свободной, связанной) в твердых, жидких образцах и газах в автоматическом режиме в широком диапазоне концентраций от нескольких ppm до 100 %.

Это универсальный 4-канальный прибор, закрывающий весь возможный диапазон определения влаги в

веществах, который предусматривает метод Фишера. К титратору можно одновременно подключить до 4-х мешалок.

Управление титратором осуществляется с помощью 8,4-дюймового сенсорного ЖК-дисплея, который позволит пользователю быстро и легко настроить метод, следить за ходом анализа для каждой ячейки в реальном времени, получать доступ к результатам измерений. В каждой мешалке возможна установка как кулонометрической, так и волюмометрической ячейки.

СООТВЕТСТВИЕ НОРМАМ GMP/GLP

Титратор Фишера CA-310 полностью соответствует нормам GMP/GLP, в нем предусмотрена возможность управления правами пользователей, отобража-



ется информация о реагентах. Доступна необходимая документация для проведения валидации. Программное обеспечение поддерживает все требования GMP/GLP, FDA 21 CFR часть 11 для обеспечения целостности данных. Контроль данных полностью интегрирован в систему и включает такие функции как отслеживание и верификация данных.

Титратор Фишера CA-310 обладает рядом преимуществ, которые облегчат работу лаборатории:

- проверка целостности данных для фармацевтики;
- считыватель штрих-кода для реагентов Фишера;
- функция запуска титрования по Карлу Фишеру с помощью ножной педали или с помощью оптического сенсора. Удобно при работе в перчаточном боксе;
- модуль смены реагентов;
- термопринтер / матричный принтер и пр.

С момента изобретения метода прошло более 80 лет. За это время метод завоевал большую популярность благодаря ряду неоспоримых преимуществ по сравнению с другими методами определения содержания воды.

С 19 по 22 апреля 2022 года в Москве пройдет 20-я Юбилейная Международная выставка лабораторного оборудования и химических реактивов «АНАЛИТИКА ЭКСПО».



Компания «АВРОРА» является постоянным участником выставки и приглашает Вас посетить наш стенд № А6095 в павильоне 3, зал 13, на котором в этом году будет представлен наш новый партнер – компания SCIEX, а также наши традиционные компании-партнеры Anton Paar, Brookfield, XOS.

Мы будем рады увидеть Вас в числе наших гостей и надеемся, что посещение этого мероприятия окажется для Вас всесторонне полезным!

Сайт: www.avrora-test.ru
Телефон: 8 (495) 258-83-05.
E-mail: test@avrora-lab.com

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 12000+ адресов)

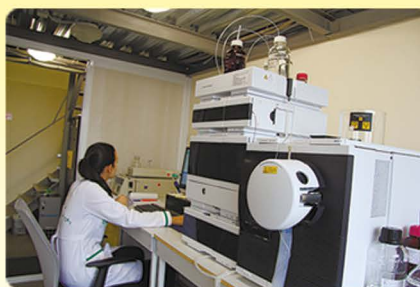
➤ Участие в качестве спикера/экспонента в конференциях, организуемых нашим изданием



О журнале

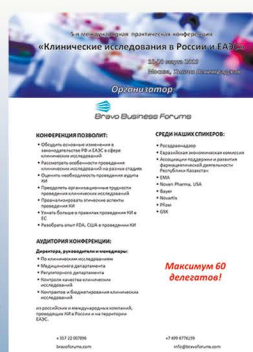
Разделы издания охватывают весь жизненный цикл лекарственного средства:

- ✓ 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 ВАК, SCOPUS.

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



- ✓ Фармацевтического форума стран ЕАЭС и СНГ.
- ✓ Российского Фармацевтического Форума.
- ✓ GMP-конференции с международным участием.
- ✓ Конференции «Дженерики и биосимиляры в России и ЕАЭС».
- ✓ Выставки «iPhEB Russia».
- ✓ Международной конференции «Что происходит на фармацевтическом рынке?».
- ✓ Выставки «Аналитика Экспо».
- ✓ Форума Биотехмед.

**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/10.33380/2305-2066-2022-11-1-23-31>
UDC 615



Research article

Comparative transcriptomic analysis of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sensitive and resistant strains

Shrutika Sakpal^{1,2*}, Sayyed Zara Abdeen², Shanker Lal Kothari¹, Virupaksha Bastikar³

¹ Amity Institute of Biotechnology, Amity University Rajasthan, Jaipur, 303002, Rajasthan, India

² Department of Biotechnology, Dr. Homi Bhabha State University, The Institute of Science, Mumbai, 400032, India

³ Amity Institute of Biotechnology, Amity University, Maharashtra, 410206, India

*Corresponding author: Shrutika Sakpal. E-mail: shrutika.r.sakpal@gmail.com

ORCID: Shrutika Sakpal – <https://orcid.org/0000-0001-6939-1183>; Sayyed Zara Abdeen – <https://orcid.org/0000-0002-8077-1117>; Shanker Lal Kothari – <https://orcid.org/0000-0002-0378-4897>; Virupaksha Bastikar – <https://orcid.org/0000-0002-5036-8191>

Received: 17.06.2021

Revised: 10.01.2022

Published: 25.02.2022

Abstract

Introduction. Malaria is the sixth leading cause of death worldwide. According to a WHO survey (2019-2020), the total number of malaria deaths is estimated to be 409000. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* are major malaria parasites, particularly in subtropical areas.

Materials and methods. In the present study, we used a transcriptome analysis of raw RNA sequence data to identify and characterize the differentially expressed genes in *Plasmodium falciparum* chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains, as well as *Plasmodium vivax* primaquine sensitive and primaquine resistant strains. The raw RNA sequence data were obtained from the NCBI SRA database using the Accession IDs PRJNA308455, SRR14191963, and SRR332573.

Results and discussion. The sequence of raw RNA was quantified, mapped, and annotated. The total number of reads mapped to the reference genome for *Plasmodium falciparum* was found to be 45474448 and for *Plasmodium vivax* was 38226870. The Cufflinks-Cuffdiff tool was used to identify differentially expressed genes in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sensitive and resistant strains. This differentially expressed gene was further annotated and plotted using the "Limma" package of Bioconductor. The PPI network was constructed in String Database and Cytoscape software. Pathway enrichment analysis of list differentially expressed gene performed using KEGG and GO tool.

Conclusion. In sensitive and resistant strains, comparative transcriptome analysis revealed differentially regulated gene expression patterns.

Keywords: Gene annotation, KEGG, Malaria, Protein-protein interaction, Transcriptome analysis

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Shrutika Sakpal developed the research plan and proposed an experimental strategy. Sayyed Zara Abdeen followed the directions to the letter. All necessary guidance was provided by Shanker Lal Kothari and Virupaksha Bastikar. All authors equally contributed to writing the current manuscript and approval of its text.

For citation: Sakpal S., Abdeen S. Z., Kothari S. L., Bastikar V. Comparative transcriptomic analysis of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sensitive and resistant strains. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):23–31. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-23-31>

INTRODUCTION

The malaria parasite cyclically infects humans via female Anopheles mosquitos. Malaria parasites enter humans through the bite of a female Anopheles mosquito. After the invasion, these malarial parasites multiply and grow in the liver's hepatocytes before moving to red blood cells (RBC). Malaria parasite broods grow in the RBC and destroy them, releasing daughter parasites (merozoites) that continue the infection cycle. Malaria symptoms are caused by blood-stage parasites. When blood-stage parasites are consumed by a female Anopheles mosquito, they mate in the mosquito's gut and begin a cycle of growth and multiplication in the mosquito itself. Sporozoites migrate to the mosquito's salivary glands after 10–18 days. When an

Anopheles mosquito sucks blood from another human, the sporozoites are injected with anticoagulant saliva and migrate to the liver, starting a new cycle [1–19]. As a result, the infected mosquito acts as a "vector" for the disease, while infected humans transmit the parasite to the mosquito. The mosquito vector, unlike the human host, is unaffected by the presence of parasites.

The most common parasite causing malaria is *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* are the most common parasites that cause malaria. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria parasites cause chronic blood-stage infections in humans that can last for weeks, months, or even years. The parasite growth processes, in which asexual merozoites invade RBC and replicate every 48 hours. *P. vivax* can survive in humans through

a reservoir of hypnozoites in the liver, in addition to blood-stage parasite replication. After being inoculated with *P. vivax* sporozoites from an infectious mosquito, some sporozoites develop into hypnozoites and remain dormant in the liver for weeks to years, until they activate to cause new blood-stage infections.

Relapses are blood-stage infections caused by the activation of *P. vivax* hypnozoites, and it is a distinguishing feature [5] between *P. vivax* and *P. falciparum*. Relapses can be avoided if an effective Primaquine is used. However, even with directly observed treatment, Primaquine does not guarantee clearance of hypnozoites in human patients with a low CYP2D6 metabolizer phenotype [19]. Chloroquine resistance, on the other hand, is a major cause of global increases in malaria mortality and morbidity in *Plasmodium falciparum*. Point mutations in the *pfcr* gene have been identified as the cause of chloroquine (CQ) resistance in recent clinical studies. According to the WHO (2019), one child dies from malaria every two minutes. It is one of the major issues because of the inability to control disease in endemic and tropical areas, population migration, and serious complications caused by the disease itself. Because of the emergence of CQ resistant strains of *Plasmodium falciparum*, *P. falciparum* malaria is more severe than *Plasmodium vivax* malaria [8, 19]. Until the last decade, few studies in Asian countries demonstrated that *P. vivax* is capable of causing severe disease due to several important biological differences, such as the development of the dormant stage in the liver causing relapse and greater transmission potential of *P. vivax* at low parasite densities, which are responsible for these observations. *P. vivax* isolates from Southeast Asia (e.g., Thailand and Myanmar), Pacific Oceania (Papua New Guinea), and South America (Mexico, Peru, and Colombia) have significantly higher nucleotide diversity at the genome level than *P. falciparum* [11]. This could be due to frequent gene flow via human movement, intense transmission, or host susceptibility variation. In Papua New Guinea, for example, *P. vivax* infections had a 3.5-fold higher rate of polyclonality and nearly double the multiplicity of infection than *P. falciparum* infections [11]. However, *Plasmodium vivax* emerging resistance to CQ endangers the health of hundreds of millions of people who are routinely exposed to the risk of infection with this organism [18]. Since 1946, CQ has been the first-line therapy for *P. vivax* – caused malaria. *Plasmodium falciparum* developed CQ resistance in the 1950s, and it is now found worldwide. *P. vivax* resistance was unknown until 1989 when Australians who returned from Papua New Guinea failed routine treatment [11]. CQ, along with the combination of Primaquine, is still used as the first-line treatment for malaria in some countries. Only CQ-sensitive *P. vivax* was discovered in Thailand, the Philippines, and Vietnam. In Indonesia, surveys revealed a low prevalence of CRPV in the west (10 %) and a higher risk in the east (45 %). [5, 8, 11]. The advancement of NGS techniques, such as transcriptome studies, has provided insights into DNA and RNA, revealing gene expression variation that occurs in *Plasmodium* species during stage

transitions and developmental processes. In this study, we characterized the transcriptional profiles of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* and compared resistant and sensitive strains to investigate the differentially expressed genes and their functions between these two strains.

MATERIALS AND METHODS

Data collection. Raw sequence data from a laboratory-adapted sensitive and resistant strain of *Plasmodium falciparum* were obtained from the NCBI SRA and deposited in the NCBI Bio project database under the accession number PRJNA308455 [12]. The raw sequence data of *Plasmodium vivax* sensitive and resistant strains are stored in the NCBI SRA under the accession numbers SRR14191963 and SRR332573.

Sequence Database curation. The raw sequence data quality in fastq files was checked using the FastQC tool [16]. Ligated adaptors were removed using the Trimmomatic tool (Bolger, A.M. et al., Germany), and all sequence quality reports were aggregated into a single report using the Multiqc tool (Philips Ewels, Sweden).

Mapping or alignment. The paired-end reads from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* were mapped to their respective reference genomes using the BWA-MEM [14] tool.

Quantification. The BWA-MEM mapping matrices were used for further quantification, using Samtool stats and samtool idx. (Heng Li, U.S.).

Assembling and DEA. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* mapped reads were assembled with their respective reference genome sequences using the Cufflinks program (Lior Pachter et al., U.S.) with default parameters. Cuffmerge was used to combine *Plasmodium falciparum* results into a single report. For *Plasmodium vivax*, we used the same method. To determine the differentially expressed genes between CQ sensitive and CQ resistant strains of *Plasmodium falciparum* and between PQ resistant and PQ sensitive strains of *Plasmodium vivax*, we used the Cuffdiff program to proceed with the Cuffmerge report of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. The differentially expressed genes identified by Cuffdiff in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* were further investigated using the Plasmodb database.

Annotations and Identification. Annotations and identifications of differentially expressed genes were performed using the Gene identifier from the Cufflinks-Gene expression output to further classify and characterize gene types and their roles. Annotations were made with the Gene Annotations and Identifiers tool in the "Plasmodb Research resources" section (Beatrice Amos. et al., U.S.).

PPI Network analysis. To find potential interactions between Differentials expressed genes of *P. falciparum* CQ sensitive and CQ resistance strain and *P. vivax* PQ sensitive and PQ resistance strain, the string database tool (Szklarczyk D. et al., German) were used to construct

PPI network. The interaction score was adjusted to >0.4 , Disconnected nodes were filtered out from the network and only active interaction sources such as Textmining, Experiment, gene fusion was applied to create a PPI network. The resulted in the PPI network being exported into Cytoscape software version 3.8.2 (Shannon. et al., U.S.) to visualize the PPI network of differential expressed genes. The confidence score of the PPI network was adjusted to >0.40 . In the PPI network, the nodes represent frontness and edges represent the interaction between different proteins. The protein with high edges connection is termed as Interactome or nodes and its neighbor protein is called interactors. To evaluate the nodes in the PPI network, we used a topological measure such as Degree(K) in Cytoscape. Degree (K) and Between centrality (BC) often use for detecting the Hub and Bottleneck in the network. The degree (K) of any node is defined as the number of edges linked to it. A node with a high degree denotes a hub, has a connection with many neighbor's proteins. Here we consider the protein nodes with a high degree (K) for functional enrichment analysis.

Functional enrichment Analysis. Functional enrichment analysis of each protein with a high degree (K) along with its neighbor protein was performed to check whether these proteins associate with any biological function and pathways. The functional enrichment and pathway analysis were done using KEGG (Minoru Kanehisa. et al., Japan) and the GO tool (Ashburner et al., U.S.).

RESULTS AND DISCUSSION

The whole-genome transcriptome analysis and comparison of sensitive and resistant *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* strains were completed successfully. Output data revealed a high degree of differentiation between sensitive and resistant strains based on gene expression and gene regulation; many genes and their functions were identified.

Quality check. The raw sequence quality of both *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* strains was

checked using the FastQC tool, and the data were further aggregated into single reports using the Multiqc tool. For further analysis, we used Phred 30 as the quality score for each sequence.

Mapped reads. After each sequence was quality-checked, it was mapped to its reference genome. The total number of *Plasmodium falciparum* paired reads mapped to the reference genome was found to be 40,454,002 (88.96 %) for CQ sensitive and 39,175,728 (93.98 %) for CQ resistant. The total number of *Plasmodium vivax* paired reads mapped to the reference genome was 28,226,870 (67.71 %) for PQ sensitive and 37,300,760 (89.47 %) for PQ resistant.

Assembly and differentially expressed genes. To identify differentially expressed genes and transcripts, total mapped reads from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* were assembled using the Cufflinks program. Using the Cuffdiff program, the differentially expressed genes were identified based on their P-values and Log2 Fold change (Fc). The P-values between CQ sensitive and CQ resistant *Plasmodium falciparum* strains were discovered to be 0.05. The total number of differentially expressed genes identified by Cuffdiff analysis was 727, with 208 up-regulated and 519 down-regulated. Whereas the P-values between *Plasmodium vivax* PQ sensitive and PQ resistant were found to be 0.05. The total number of differentially expressed genes was 2540, with 1284 up-regulated and 1256 down-regulated (Figure 1). Using the Bioconductor Limma package, we plotted P-values against Log2Fc in a volcano plot (Figure 2) to describe significantly expressed genes between CQ, PQ sensitive, and resistant strains.

Genes Annotations. The differentially expressed genes were further identified and characterized based on their gene identifier using Plasmodb's tool. The identified genes appeared to be protein-coding genes involved in the production of surface antigens, invasion, pathogenesis, and virulence, revealing a significant difference between sensitive and resistant strains. We began by determining the functions of five highly expressed genes in both species (Table 1 and 2). The five most abundant

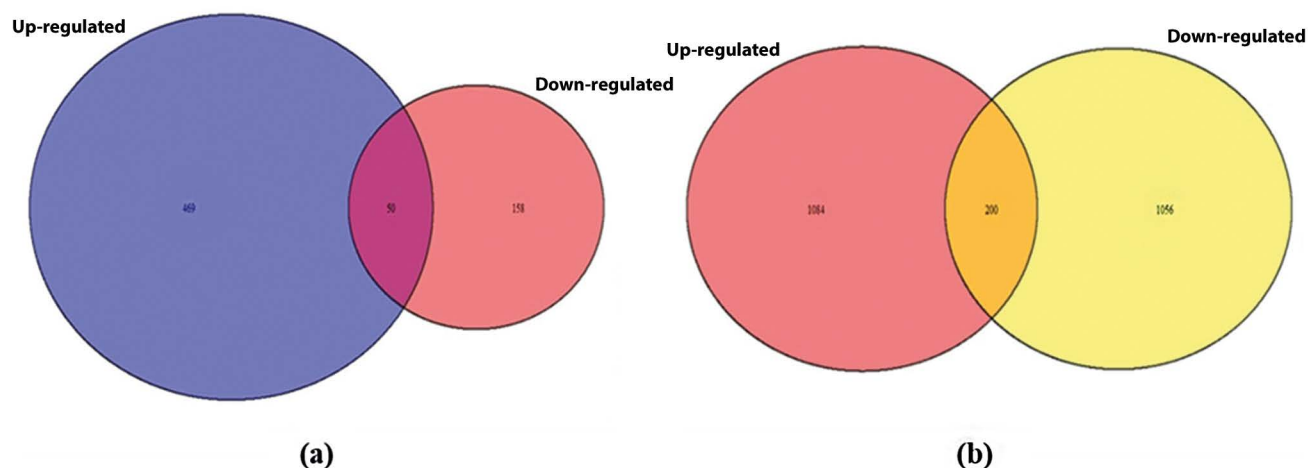


Figure 1. Up-regulated and down-regulated genes of (a) *P. falciparum* and (b) *P. vivax*

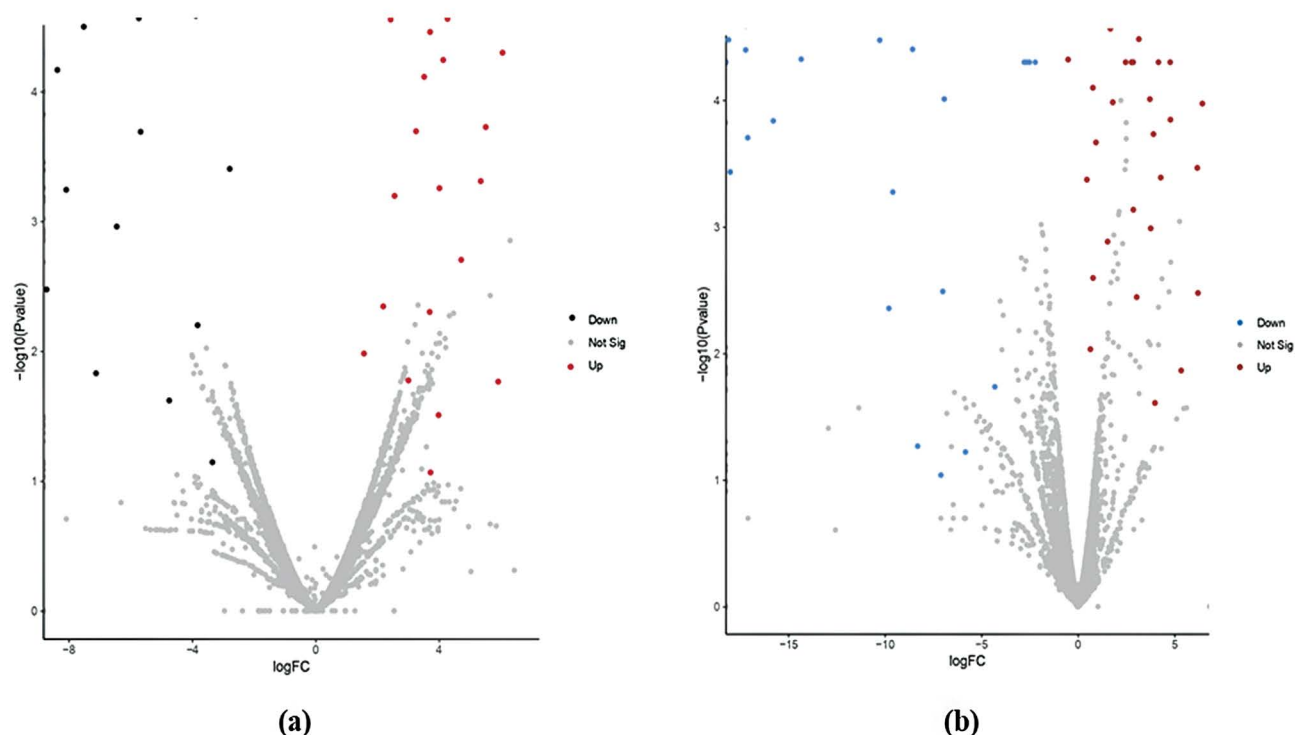


Figure 2. Differentially expressed gene of (a) *P. falciparum* and (b) *P. vivax*

genes in *P. vivax* strains were discovered to be genes coding for Reticulocyte binding protein, ADP Ribosylation factor, RNA pseudouridylate synthase, Rhopty neck protein-5, and E3 ubiquitin-protein ligase. Multidrug resistance protein (PfMRP), Erythrocyte membrane protein (PfEMP), Hsp70, Hsp90, and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase were discovered to be the five most highly expressed genes in *Plasmodium falciparum* strains.

PPI Network Analysis. The PPI network was generated with help of a string database tool using DEGs of *P. falciparum* CQ sensitive and CQ resistance strain. The PPI network visualized in Cytoscape consists of 50 nodes and 71 edges (Figure 3). The result of the PPI network in

Cytoscape, show that *Plasmodium falciparum* Nucleoside Diphosphate Kinase(PfNDK) was hub(with largest degree $K = 13$) following with sub interactome *Plasmodium falciparum* Mitochondrial processing peptidase- α (PfMPP- α), *Plasmodium falciparum* Proliferating Cell Nuclear Antigen (PfPCNA),1-deoxy-D-5-phosphate reductoisomerase (DXR), *Plasmodium falciparum* Ribosomal protein L-35 (PfRPL-35), *Plasmodium falciparum* Multidrug resistance protein-1 (PfMDRP-1), *Plasmodium falciparum* Glycophosphodiesterase (PfGDPD), *Plasmodium falciparum* TOC-75(PfTOC-75) with many interconnected nodes. PfNDK protein shows direct interaction with neighbor proteins such as GCP-2, RP-L35, PfExP, PCNA, Kinase, DXR, etc. The giant components of the PPI network

Table 1. Gene Annotation of *Plasmodium falciparum*

Gene_Id	Description	Function	Genomic Location
Gene- PF3D7_1462800	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Production of Energy through the Glycolytic pathway require for developing malaria Parasite.	Pf3D7_14_v3:2,558,055..2,560,979(+)
Gene- PF3D7_0818900	Hsp-70	Refolding of nascent protein. Assembly-dissemble of a multiprotein complex, Protein translocation, Protein degradation, Prion replication	Pf3D7_08_v3:858,550..862,980(+)
Gene- PF3D7_0708400	Hsp-90	Development of malaria parasite and regulation of cell cycle	Pf3D7_07_v3:380,449..385,546(+)
PF3D7_0523000	Multidrug Resistance Protein	Energy-dependent efflux pump, responsible for effluxing drug accumulation across the membrane	Pf3D7_05_v3:955,955.963,095(+)
PF3D7_0600600	Erythrocytes Membrane Protein	Highly variable proteins, mediate cytoadhesion of infected erythrocytes to human endothelium facilitating further binding with uninfected RBC, helping parasitic schizont to invade and infect new RBC	Pf3D7_06_v3:29,618.31,484(-)

Table 2. Gene Annotation of *Plasmodium vivax*

Gene_Id	Description	Function	Genomic Location
Gene-PVX_089055	E3 ubiquitin-protein ligase, putative	Protein ubiquitylation. Example: Tagging proteins for proteasomal degradation, or targeting to other distinct Sub-cellular locations	Pv_Sal1_chr05:259,893..285,703(+)
Gene-PVX_089530	Rhoptryneck protein 5, putative	P.v RON-5 play a crucial role during host cell invasion, in erythrocyte, hepatocytes, mosquito salivary gland	Pv_Sal1_chr05:634,671..642,746(+)
Gene-PVX_080660	RNA pseudouridylylate synthase, putative	Pseudouridylation, methylation, control multiple stages of gene expression regulations.	Pv_Sal1_chr10:829,185..863,703(-)
PF3D7_1252400	Reticulocyte Binding Protein	Antigenic protein highly expresses in schizont responsible for invasion and infection in erythrocyte cells and targeting human immune response	Pf3D7_12_v3:2,136,053..2,144,874(+)
PVX_001905	ADP-Ribosylation Factor	ADP-Ribosylation factor is a member of the ARF family of GTP binding protein. It is a major component of the Vesicular trafficking pathway, which plays a crucial role in the pathogenesis and survival of the malarial parasite	Pv_Sal1_chr06:240,794..242,171(-)

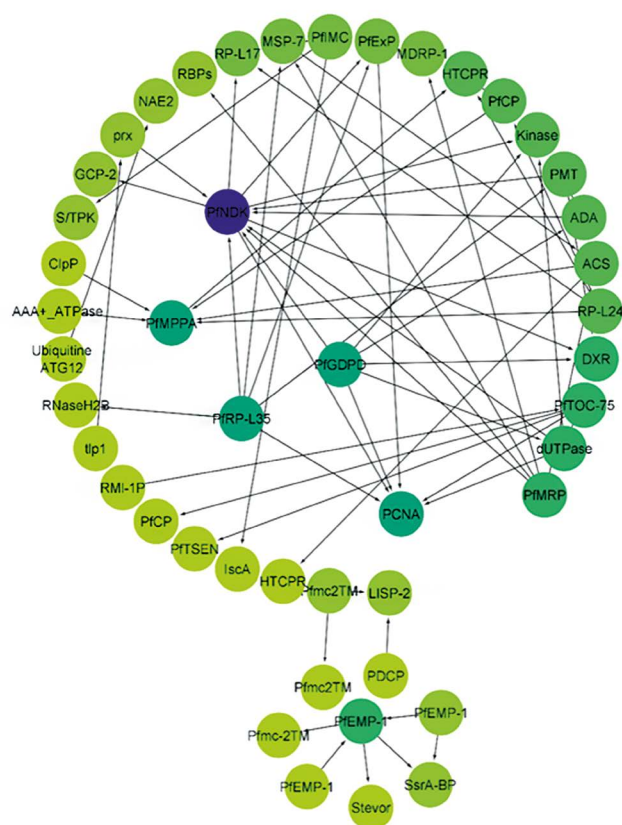


Figure 3. Protein-Protein Interaction (PPI) pathway of DEGs of *P. falciparum* strains

of *P. vivax* using DEGs were also generated in string database and visualized in Cytoscape using Degree(K) parameters (Figure 4). The results of the PPI network showing 70 nodes and 148 edges. Proteins with the highest degree were found to be Helicase (K = 28), DNA polymerase δ -1(POLD1) and Flap endonuclease-1(FEN-1) (K = 16), Reticulocyte binding protein(RBPs) (K = 11), RNA helicase protein(RNAHP) (K = 10) following with ADP Ribosylation factor (ARFs), Replication factor C-1 (RFC1), *Plasmodium falciparum* Dynein light chain-1 (PfDLC-1).

Histone acetyltransferase (HAT), Transporter protein and Splicing factor. Protein with higher degree showing more connection with their neighbor proteins like Exonuclease, Replication factor C-1 (RFC-1), AAA+Adenosine Triphosphatase, Stevor.

Functional enrichment analysis: Gene ontology using protein with the highest degree was analyzed to check whether this protein associate with any biological function. According to our finding, *Plasmodium falciparum* Nucleoside Diphosphate Kinase (PfNDK) has the highest interactors showing interaction with other protein and protein molecules such as Ribosomal Protein L-35 (RPL-35), Kinase, Mitochondrial processing Peptidase α (MPP- α), Multi-Drug resistance protein (PfMRP). All these proteins sharing multiple interconnected functions in the Drug resistance pathway, Dna-Rna replication, DNA damage response and repair mechanism, Energy production, Cell cycle, and growth regulation inside the host body, which is a significant feature of any drug resistance parasite.

The protein molecules with the highest degree, Helicase, Flap endonuclease-1 (FEN-1), DNA Polymerase δ -1 (POLD1), Histone Acetyltransferase (HAT) in PPI network of *P. vivax* sharing interaction with other protein network and subnetwork, such as ADP ribosylation factors (ARFs), RNA Helicase, Replication Factor-C (RFC), Transporter protein, Splicing factor. The Association of these protein molecules has biological functions in an event such as erythrocyte invasion, Vehicular trafficking pathway, Viral genome replication and transcription in host, Pathogenesis, and drug resistance pathway.

The function of all the interactomes along with its neighbor protein (given below in Table 3 and 4) showing a significant role in immune tolerance, immune response, invasion, and Viral genome replication and translation inside the host body.

Plasmodium falciparum and *Plasmodium vivax* are the main strains causing malaria. *P. falciparum* CQ resistance and *P. vivax* Primaquine resistance are the major cause of increases in malaria mortality and morbidity rate worldwide. The progress in Computational Biology and

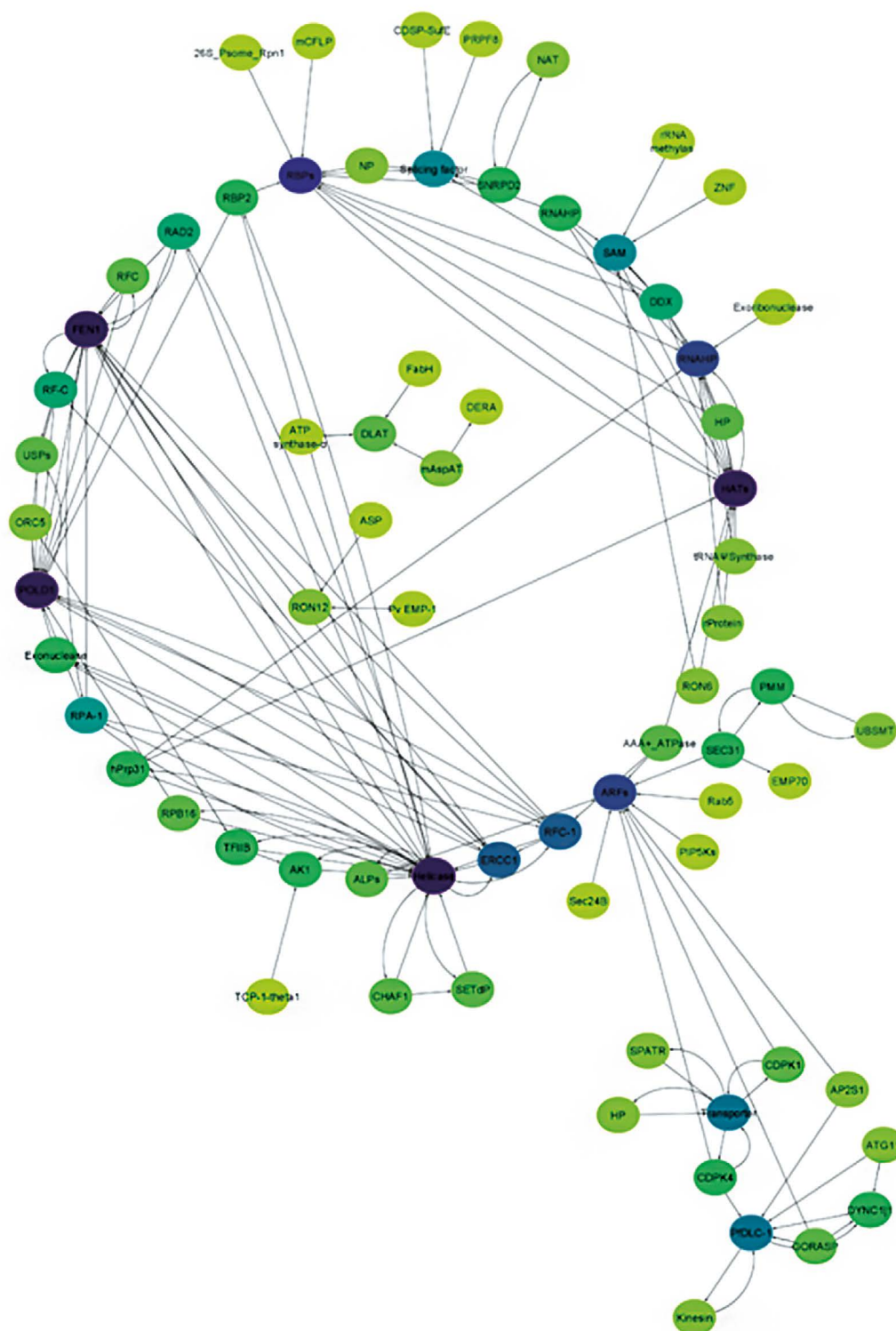


Figure 4. Protein-Protein Interaction (PPI) pathway of DEGs of *P. vivax* strains

Bioinformatics has simplified most of the research and study of malaria agents, it also has minimized the duration of the research from years to a month. Transcriptome analysis is one of those computational techniques. The transcriptome is a comprehensive analysis of whole sets of RNA of an organism's cell, tissue, or organ at a particular

time and condition. Whole-genome transcriptome analysis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* provided the path for gene expression study using the whole genome sequence of malarial parasite. This is the first study to investigate the difference between CQ sensitive and CQ resistance of *P. falciparum* and PQ

Table 3. Function analysis of *P. falciparum* PPI network Protein

Sr. No	Protein name	Description	Function
1	PfNDK	<i>Plasmodium falciparum</i> Nucleoside Diphosphate Kinase	The catalytic enzyme requires for the production of nucleotides. Require for intracellular parasites proliferation, cell secretion, energy production, Apoptosis, DNA binding, and DNA repair mechanism
2	PfMPP α	<i>P. falciparum</i> Mitochondrial Processing Peptidase- α	DNA binding. Regulations of DNA synthesis, Leading strand elongation, Mismatch repair
3	PfRPL-35	<i>P. falciparum</i> Ribosomal Protein L-35	Structure constituents of ribosomes. Require for mRNA binding, Maturation of LSU reran from triastronic rRNA transcript
4	ERCC-1	<i>P. falciparum</i> Excision Repair ERCC1	Regulate drug resistance pathway. Help in nucleotide excision repair pathway
5	PfPCNA	<i>P. falciparum</i> Proliferating Cell Nuclear Antigen	Participate in DNA damage response pathway. Overexpression of PCNA help in the survival of malarial parasites in a genotoxic environment. Require for nucleic acid metabolism
6	PfDXR	1-deoxy-D-xylose 5-phosphate reductoisomerase	Contribute to MEP (2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphate) pathway for Isoprenoid synthesis
7	PfMRP	<i>P. falciparum</i> Multidrug Resistance Protein	Member of ATP binding cassette (ABC) transport superfamily. Energy-driven efflux pump responsible for effluxing drug accumulation in food vacuoles of parasites
8	PfGDPD	<i>P. falciparum</i> Glycerophosphodiesterase	Mg (2+) dependent enzymes catalyze glycerophospholipids during the growth of asexual intraerythrocytic malarial parasites. Hence important in parasite's growth and pathogenicity
9	PfToc-75	<i>P. falciparum</i> Toc-75	Toc-75 play important role in protein secretion, outer membrane protein assembly, and bacterial growth
10	PfRPL-35	<i>P. falciparum</i> Ribosomal protein L-35	Regulate viral genome replication, transcription, and initiation of translation in the host cell
11	PfEMP-1	<i>P. falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein-1	Act as adhesion antigenic protein. Mediate adhesion of infected erythrocytes to human endothelium, facilitating binding with uninfected RBC by sequestration and resetting process. Hence spreading parasites pathogens in blood

Table 4. Function analysis of *P. vivax* PPI network Proteins

Sr. No	Protein name	Description	Function
1	Helicase	Helicase	Essential for regulation of viral genome replication-translation, DNA repair, mRNA splicing, Autophagy, Homeostasis
2	PvFEN	<i>P. vivax</i> Flap endonuclease	Play a crucial role in DNA repair mechanism. Exhibit RNase H activities
3	PvPOLD1	<i>P. vivax</i> DNA polymerase δ -1	Catalytic components of trimeric and tetrameric DNA polymerase require for high fidelity genome replication, lagging strand synthesis, and repair
4	PvHAT	<i>P. vivax</i> Histone Acetyltransferase	Require for parasites cell growth and differentiation. Acetylate conserved lysine residue on histone protein present in euchromatin, hence causing transcriptional activation
5	PvRBP	<i>P. vivax</i> Reticulocyte Binding Protein	In <i>P. vivax</i> , RBP helps parasites schizont in RBC invasion and targeting immune response to cause immune tolerance in parasites
6	PvRNA-H	<i>P. vivax</i> RNA Helicase	Function in RNA metabolism such as unwinding, annealing of RNA molecules, clamping protein complex on RNA remodeling ribonucleo-protein complex
7	PvARF	<i>P. vivax</i> ADP Ribosylation Factor	ARF is a member of the ARF family GTP binding protein of the Ras superfamily. It is a major component of the Vesicular trafficking pathway, plays a crucial role in parasite survival and pathogenesis
8	PvRF-C	<i>P. vivax</i> Replication Factor-C	Replication Factor-C acts as a clamp loader in replication, involve in catalyzing to loading Proliferation cell nuclear antigen onto DNA So that it can encircle the DNA
9	PvTransporter protein	Transporter protein	An integral membrane protein facilitates the movement of nutrients, metabolites, inorganic ions into and out of the intraerythrocytic as well as between the subcellular compartment of parasites. Transporter protein is thought to efflux drug compounds out of the cellular compartments
10	PvDLC-1	<i>P. vivax</i> Dynein light chain-1	The dynein light chain is a member of the leucine-rich protein family. Help in controlling movement and accessibility of late trophozoites and schizonts into RBC

sensitive and PQ resistance of *P. vivax* at a genomic level using the whole genome sequence of malarial parasite. Through comparative transcriptome study between resistance and sensitivity of both *P. falciparum* and *P. vivax* parasite, differentially expressed genes including protein-coding genes involved in pathogenesis, invasion, surface antigens, cell cycle development, etc. were revealed. PfMRP, PfEMP, Hsp70, Hsp90, PfGDPD are the top 5 highly expressed genes between resistance and sensitive strain of *P. falciparum*. These genes code proteins, responsible for Multidrug resistance, Erythrocyte cell invasion and adhesion, nascent protein folding, assemble-dissemble of a multiprotein complex, protein translocation, protein degradation, prion replication, cell cycle regulation, and energy metabolism. Whereas highly expressed gene differencing between sensitive and resistant strains of *P. vivax* is gene code for Reticulocyte binding protein, ADP Ribosylation factor, E3 ubiquitin-protein ligase, Rhoptry neck protein 5 (RON-5), RNA pseudouridylation synthase. Reticulocytes binding protein play a crucial role in infecting reticulocyte subpopulation of red blood cells for invasion and targeting human immune response. ADP Ribosylation factor play role in the regulation of the Vesicular trafficking pathway and actin remodeling. The vesicular trafficking pathway increases malarial parasite survival rate and pathogenesis inside the host. Ubiquitin ligase is involved in protein ubiquitination. For example, tagging proteins for proteasomal degradation, or targeting other distinct subcellular locations, *P. vivax* RON-5 helps host cell invasion, such as human erythrocytes, hepatocytes, or mosquito salivary glands. Gene coding for RNA of pseudouridylation synthase responsible for pseudouridylation, methylation, control multiple stages of gene expression regulations. Through PPI network analysis and functional enrichment analysis, we can find protein correlation with other proteins, which helps us to understand DEGs' function in the particular biological pathway and biological function. In the PPI network, most of the protein is protein molecules i. e. enzymes. In the PPI network of *Plasmodium falciparum*, proteins such as Nucleoside diphosphate kinase, Toc-75, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, Mitochondrial processing peptidase, and Proliferation cell nucleus antigen sharing interconnection. All these proteins together work in DNA replication, DNA repair mechanism, RNA transcription and translation, Cell proliferation, Parasite growth. Further interaction of Helicase, Flap endonuclease, Histone acetyltransferase, RNA helicase, Replication factor-c, and Transporter protein with each other share same multifunction such as host cell attachment, parasite genome, replication, RNA transcription, and mRNA translation in the host.

Through the overall study, we find that gene coding for proteins such as Multiple drug resistance protein, Erythrocytes membrane protein, proliferating cell nuclear antigen, Glycerophosphodiesterase, HSP-70/90 may be the reason behind drug resistance and immune tolerant

property of CQ resistance *P. falciparum* strain. In *P. vivax*, the gene coding for protein such as ADP Ribosylation factor, Reticulocyte binding protein, Rhoptry neck protein, Transporter protein may be the reason behind PQ resistance.

A limitation of this study is the lack of wet-lab experiments. All the results are based on the dry lab method and experiments. Hence for confirmation, the need of wet lab experiment is needed.

CONCLUSION

Comparative transcriptome analysis of *P. falciparum* CQ sensitive and CQ resistant strains, as well as *P. vivax* PQ sensitive and PQ resistant strains, was performed using whole-genome sequences. Comparative transcriptome analysis revealed differentially regulated gene expression patterns in sensitive and resistant strains. The total number of differentially expressed genes between resistant and sensitive *P. falciparum* strains was 727, with 208 up-regulated and 519 down-regulated genes, and the total number of differentially expressed genes between resistant and sensitive *P. vivax* strains was 2540, with 1284 up-regulated and 1256 down-regulated genes. Differentially expressed genes in *P. falciparum* and *P. vivax* sensitive and resistant strains code for the surface antigen, proteins involved in invasion and pathogenesis, virulence, and cell cycle development. The most common genes were discovered to code for Multidrug resistance, Reticulocyte binding protein, Erythrocyte membrane protein, Transporter protein, Vir-9, Rifin, Transmembrane, and Conserved Plasmodium proteins, which are involved in transportation, attachment, invasion, and pathogenesis, drug resistance, immune tolerance. The highly expressed genes between the sensitive and resistant strain of *P. falciparum* aid in signal transduction, nascent protein refolding, enzyme activation-deactivation, drug resistance, and erythrocyte infection. Whereas gene between *P. vivax* sensitive and resistant strains are in charge of protein ubiquitylation as well as host cell invasion, pathogenesis. When compared to sensitive strains, all of these genes were highly expressed in *P. falciparum* and *P. vivax* resistance strains. As a result, these genes may be responsible for CQ and PQ drug resistance.

REFERENCES

1. Aurrecochea C., Brestelli J., Brunk B. P., Dommer J., Fischer S., Gajria B., Gao X., Gingle A., Grant G., Harb O. S., Heiges M., Innamorato F., Iodice J., Kissinger J. C., Kraemer E., Li W., Miller J. A., Nayak V., Pennington C., Pinney D. F., Roos D. S., Ross C., Stoeckert C. J., Treatman C., Wang H. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(Database):D539–D543. DOI: 10.1093/nar/gkn814.
2. Ford A., Kepple D., Abagero, B. R., Connors J., Pearson R., Auburn S., Getachew, Ford C., Gunalan K., Miller L. H., Janies D. A., Rayner J. C., Yan G., Yewhalaw D., Lo, E. Whole genome sequencing of *Plasmodium vivax* isolates reveals frequent sequence and structural polymorphisms in erythrocyte binding genes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2020;14(10):e0008234. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008234

3. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
4. Andrews S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> Accessed: 25.11.2021.
5. Bousema T., Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clinical microbiology reviews*. 2011;24(2):377–410.
6. Hartzell J. D., Aronson N. E., Weina P. J., Howard R. S., Yadava A., Wortmann G. W. Positive rK39 serologic assay results in US service-men with cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2008;79(6):843–846.
7. Bozdech Z., Llinás M., Pulliam B. L., Wong E. D., Zhu J., DeRisi J. L., Ward G. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS biology*. 2003;1(1):e5.
8. Cui L., Mascorro C. N., Fan Q., Rzomp K. A., Khuntirat B., Zhou G., Chen H., Yan G., Sattabongkot J. Genetic diversity and multiple infections of *Plasmodium vivax* malaria in Western Thailand. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;68(5):613–619. DOI: 10.4269/ajtmh.2003.68.613.
9. Blankenberg D., Von Kuster G., Bouvier E., Baker D., Afgan E., Stoler N., Galaxy Team, Taylor J., Nekrutenko A. Dissemination of scientific software with Galaxy ToolShed. *Genome biology*. 2014;15(2):1–3.
10. Afgan E., Baker D., Batut B., van den Beek M., Bouvier D., Cech M., Chilton J., Clements D., Coraor N., Grüning B. A., Guerler A., Hillman-Jackson J., Hiltmann S., Jalili V., Rasche H., Soranzo N., Goecks J., Taylor J., Nekrutenko A., Blankenberg, D. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic acids research*. 2018;46(W1):W537–W544. DOI: 10.1093/nar/gky379.
11. Fola A. A., Harrison G. A., Hazairin M. H., Barnadas C., Hetzel M. W., Iga J., Siba P. M., Mueller I., Barry A. E. Higher complexity of infection and genetic diversity of *Plasmodium vivax* than *Plasmodium falciparum* across all malaria transmission zones of Papua New Guinea. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2017;96(3):630–641. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0716.
12. Antony H. A., Pathak V., Parija S. C., Ghosh K., Bhattacharjee A. Whole transcriptome expression analysis and comparison of two different strains of *Plasmodium falciparum* using RNA-Seq. *Genome Data*. 2016;8:110–112. DOI: 10.1016/j.gdata.2016.04.004.
13. Kukurba K. R., Montgomery S. B. RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2015;2015(11):pdb.top084970. DOI: 10.1101/pdb.top084970.
14. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. 2013. Available at: <https://arxiv.org/abs/1303.3997>. Accessed: 25.11.2021.
15. Ritchie M. E., Phipson B., Wu D. I., Hu Y., Law C. W., Shi W., Smyth G. K. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(7):e47–e47.
16. PlasmoDB: An integrative database of the *Plasmodium falciparum* genome. Tools for accessing and analyzing finished and unfinished sequence data. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(1):66–69. DOI: 10.1093/nar/29.1.66.
17. Trapnell C., Roberts A., Goff L., Pertea G., Kim D., Kelley D. R., Pimentel H., Salzberg S. L., Rinn J. L., Pachter L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols*. 2012;7(3):562–578.
18. World Health Organization. In vitro micro-test (Mark III) for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, amodiaquine, sulfadoxine (No. CTD/MAL/97.20 Rev. 2 2001). World Health Organization. 2001.
19. World malaria report 2019. World malaria report 2019. In WHO Regional Office for Africa. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>. Accessed: 25.11.2021.

Свойства и перспектива применения белка молочной сыворотки лактоферрина в медицине и ветеринарии (обзор)

Е. Т. Жиликова¹, О. О. Новиков², А. В. Хмыров¹, Д. А. Фадеева^{1*}, В. Э. Гуляева¹,
А. Ю. Малютин¹, Н. В. Автина¹

¹ ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»), 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

* Контактное лицо: Фадеева Дарья Александровна. E-mail: fadееva@bsu.edu.ru

ORCID: Е. Т. Жиликова – <https://orcid.org/0000-0002-8685-1601>; О. О. Новиков – <https://orcid.org/0000-0003-3145-6783>; А. В. Хмыров – <https://orcid.org/0000-0002-5813-9676>;
Д. А. Фадеева – <https://orcid.org/0000-0002-5539-1390>; В. Э. Гуляева – <https://orcid.org/0000-0003-1546-8442>; А. Ю. Малютин – <https://orcid.org/0000-0001-6170-2151>;
Н. В. Автина – <https://orcid.org/0000-0001-5506-515X>.

Статья поступила: 06.08.2021

Статья принята в печать: 12.01.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Лактоферрин – биологически активное вещество, природный гликопротеин, относящийся к семейству железосодержащих белков трансферринов. Настоящая статья посвящена обзору литературных данных о свойствах и перспективах применения лактоферрина в медицине и ветеринарии.

Текст. Проблема широкого использования такого многообещающего с точки зрения фармакологии агента, как лактоферрин, заключается в необходимости использования большого объема сырья, сложности извлечения его из сельскохозяйственного сырья и последующей очистки. Ввиду этого в настоящее время весьма перспективным является использование трансгенных животных для получения такого ценного соединения в необходимом объеме. Лактоферрин впервые был обнаружен в коровьем молоке в 1939 году. В течение последующих лет был подтвержден широкий спектр биологической активности лактоферрина, постоянно устанавливаются новые свойства данного белка. Наиболее исследованы иммуномодулирующее действие, противовоспалительная, антимикробная, противовирусная, противогрибковая активность лактоферрина, начаты изыскания возможности применения данного соединения для лечения и профилактики новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, а также для предотвращения постковидных осложнений. В последние годы активно исследуется противоопухолевая активность лактоферрина, перспективы использования в качестве биомаркера для ранней диагностики нейродегенеративных заболеваний. Особенную роль лактоферрин может играть в процессе доставки лекарственных средств к органам-мишеням, а также при изготовлении функциональных продуктов питания и различных лекарственных препаратов как для человека, так и для животных.

Заключение. Таким образом, в результате анализа научной литературы о широком спектре биологической активности лактоферрина перспективной и целесообразной является разработка составов и технологии лекарственных препаратов, функциональных продуктов питания, ветеринарной и животноводческой продукции на основе данного соединения.

Ключевые слова: лактоферрин, биологическая активность, противовирусное действие, иммуномодулирующее действие, лекарственное средство

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Е. Т. Жиликова и Н. В. Автина проводили обзор литературных данных об использовании лактоферрина в качестве носителя лекарственных средств. О. О. Новиков и А. Ю. Малютин проводили обзор литературных данных о способах получения и очистки лактоферрина. В. Э. Гуляева и Д. А. Фадеева проводили литературный обзор о биологической и фармакологической активности лактоферрина. А. В. Хмыров проводил литературный обзор о применении лактоферрина в ветеринарии. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и в написании текста статьи.

Для цитирования: Жиликова Е. Т., Новиков О. О., Хмыров А. В., Фадеева Д. А., Гуляева В. Э., Малютин А. Ю., Автина Н. В. Свойства и перспектива применения белка молочной сыворотки лактоферрина в медицине и ветеринарии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):32–39. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-32-39>

Properties and Prospects of Application of the Whey Protein Lactoferrin in Medicine and Veterinary Medicine (Review)

Elena T. Zhilyakova¹, Oleg O. Novikov², Alexey V. Khmyrov¹, Darya A. Fadeeva^{1*},
Valeriya E. Gulyaeva¹, Anastasiya Yu. Malyutina¹, Natalya V. Avtina¹

¹ Belgorod National Research University, Department of Pharmaceutical Technology, 85, Pobedy str., Belgorod, 308015, Russia

² Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

* Corresponding author: Darya A. Fadeeva. E-mail: fadееva@bsu.edu.ru

ORCID: Elena T. Zhilyakova – <https://orcid.org/0000-0002-8685-1601>; Oleg O. Novikov – <https://orcid.org/0000-0003-3145-6783>; Alexey V. Khmyrov – <https://orcid.org/0000-0002-5813-9676>;
Darya A. Fadeeva – <https://orcid.org/0000-0002-5539-1390>; Valeriya E. Gulyaeva – <https://orcid.org/0000-0003-1546-8442>;
Anastasiya Yu. Malyutina – <https://orcid.org/0000-0001-6170-2151>; Natalya V. Avtina – <https://orcid.org/0000-0001-5506-515X>.

Received: 06.08.2021

Revised: 12.01.2022

Published: 25.02.2022

© Жиликова Е. Т., Новиков О. О., Хмыров А. В., Фадеева Д. А., Гуляева В. Э., Малютин А. Ю., Автина Н. В., 2022
© Zhilyakova E. T., Novikov O. O., Khmyrov A. V., Fadeeva D. A., Gulyaeva V. E., Malyutina A. Yu., Avtina N. V., 2022

Abstract

Introduction. Lactoferrin is a biologically active substance, a natural glycoprotein from the group of iron-containing proteins, transferrin. This article is devoted to a review of the literature data on the properties and prospects for the use of lactoferrin in medicine and veterinary medicine.

Text. The problem of widespread use of lactoferrin is the need to use a large volume of raw materials, the difficulty of extracting it from agricultural raw materials and subsequent purification. In this view, at present, it is very promising to use transgenic animals to obtain such a valuable compound in the required volume. Discovered in 1939 in cow's milk, lactoferrin exhibits a wide spectrum of biological activity, new properties of this protein are constantly being established. The most studied are the immunomodulatory effects, anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral, antifungal activities of lactoferrin, and the search for the possibility of using this compound for the treatment and prevention of the new coronavirus infection SARS-CoV-2, as well as for the prevention of postCOVID complications, has begun. In recent years, the antitumor activity of lactoferrin has been actively studied, as well as the prospects for its use as a biomarker for early diagnosis of neurodegenerative diseases. Lactoferrin can play a special role in the delivery of drugs to target organs, as well as in the manufacture of functional food products and various drugs for both humans and animals.

Conclusion. Thus, the performed theoretical study and the data obtained on a wide spectrum of biological activity of lactoferrin confirm the prospects and expediency of the development of formulations and technology of drugs, functional food products, veterinary drugs and animal products based on lactoferrin.

Keywords: lactoferrin, biological activity, antiviral effect, immunomodulatory effect, drug

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Elena T. Zhilyakova and Natalya V. Avtina conducted a review of the literature data on the use of lactoferrin as a carrier of drugs. Oleg O. Novikov and Anastasiya Yu. Malyutina conducted a review of the literature data on the methods of obtaining and purifying lactoferrin. Valeriya E. Gulyaeva and Darya A. Fadeeva conducted a literature review on the biological and pharmacological activity of lactoferrin. Alexey V. Khmyrov conducted a literature review on the use of lactoferrin in veterinary medicine. All authors participated in the discussion of the results and in writing the text of the article.

For citation: Zhilyakova E. T., Novikov O. O., Khmyrov A. V., Fadeeva D. A., Gulyaeva V. E., Malyutina A. Yu., Avtina N. V. Properties and prospects of application of the whey protein lactoferrin in medicine and veterinary medicine. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):32–39. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-32-39>

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении всего существования человечество постоянно ведет поиски новых агентов, обладающих биологической активностью, которые могут быть использованы в качестве лекарственных средств. Изыскания все чаще приводят нас к выводу, что идеальными кандидатами на эту роль являются природные соединения, как растительного, так и животного происхождения.

Одним из основных направлений предупреждения заболеваемости человека и животных, а также снижения показателей заболеваемости является профилактика и укрепление всех систем организма. В этой связи актуальным и необходимым является поиск и изучение биологически активных веществ, действие которых направлено на укрепление систем и органов. Одним из таковых является белок молочной сыворотки – лактоферрин. Целью настоящего обзора стало изучение и анализ литературных данных о биологических, терапевтических и физиологических свойствах лактоферрина.

Структура и источники получения лактоферрина

Лактоферрин представляет собой multifunctional белок, обладающий широким набором биологических свойств, он проявляет множественные за-

щитные функции в организме и является ключевым компонентом врожденного иммунитета. Помимо непосредственного действия на инвазивные инфекционные агенты, лактоферрин также является мощным иммуномодулятором, регулируя пролиферацию и дифференциацию различных клеток несистемной и адаптивной иммунной системы. Кроме того, он проявляет антиоксидантную активность, регулирует процесс воспаления и поддерживает гомеостаз в организме животных и человека [1].

По своему строению лактоферрин относится к группе белков трансферринов и состоит из одной полипептидной цепи, которая может быть разделена на две гомологичные части, общая длина цепи составляет от 680 до 700 аминокислот. Гомологичные половины образуют глобулярные доли (C- и N-доли), соединенные спиральным участком из одиннадцати аминокислот, при этом молекула белка несимметрична.

В природе лактоферрин находится в двух формах: связанной (хололактоферрин) и несвязанной (аполактоферрин) с ионами железа, причем соотношение между формами составляет 1:5, что несет определенную функциональную нагрузку. Так как изоэлектрическая точка лактоферрина выше 7 (8,7), данный белок относится к щелочным, с ионами железа он способен образовывать комплексы, при этом в молекуле лактоферрина присутствуют два центра связывания (по одному в каждой глобуле). В каждом

центре атом железа координируется с шестью лигандами – четырьмя полипептидными и двумя карбонатными либо гидрокарбонатными [2].

Биосинтез лактоферрина молока, слюны, слез и других экскретов проходит в железистых клетках соответствующих эпителиальных тканей, лактоферрин сыворотки крови синтезируются в нейтрофилах, причем физико-химические и иммунохимические свойства экскреторного и сывороточного лактоферрина идентичны [3]. Кроме того, установлено, что структура доменов лактоферрина человека и многих млекопитающих гомологична. В наибольшей концентрации лактоферрин содержится в молоке и молозиве – 1–3 мг/мл и 5–7 мг/мл, соответственно, чем, собственно, и обусловлено название этого белка [4].

Проблемой выделения лактоферрина из природного сырья исследователи озадачились практически сразу после открытия этого белка. Так, известен способ выделения лактоферрина из молока химическим способом с использованием сульфатных соединений, сорбционным способом с использованием полисахаридов, а также методом иммуноаффинной хроматографии [5].

Естественно, наиболее простым в получении является бычий лактоферрин, тем более что не обнаружено значительной разницы между бычьим и человеческим лактоферрином: последовательность аминокислот высоко гомологична и схожи биологические свойства [6].

Многочисленные исследования физико-химических свойств лактоферрина показали, что, хотя в отличие от остальных белков, он более устойчив в кислой среде желудка, он все-таки подвержен денатурации при повышенных температурах и некоторых других физико-химических воздействиях. Так, установлено, что наиболее стабилен лактоферрин при pH 4,0, однако в кислой среде активно разрушается третичная структура белка, и высвобождаются ионы железа, обеспечивающие ряд его фармакологических свойств. Поэтому рекомендованный уровень pH для выделения лактоферрина из биологического сырья выше 6,5. Кроме того, установлено, что термическая денатурация аполактоферрина протекает при 70 °C, а хололактоферрина – при 90 °C [7].

В качестве альтернативы термической пастеризации молока для получения лактоферрина предложена обработка сырья высоким давлением, при этом наблюдалось лучшая сохранность нативного лактоферрина [8].

В настоящее время в мировой практике приняты два стандарта качества коммерческого бычьего лактоферрина – Novel Food в Европейском союзе и GRAS в США – они регламентируют высокую чистоту лактоферрина (более 95 %) в производимом продукте [9].

Наиболее часто для выделения лактоферрина из биологического сырья применяются хроматографические методы, а именно ионнообменную и аффинную хроматографию, однако применяется и электро-

диализ [10, 11]. Так, разработана методика отделения лактоферрина от других белков молока с использованием электродиализа с фильтрационной мембраной, при этом рекомендовано использование частично деминерализованной сыворотки для повышения целевого выхода продукта [12].

В настоящее время наиболее применимы порошкообразные формы лактоферрина. После выделения чистого белка хранение его в растворе нецелесообразно из-за риска микробной контаминации и возможности разрушения белковой структуры. Поэтому наиболее рационально использование таких технологических приемов, как лиофильная и распылительная сушки для получения порошка лактоферрина [7].

Одним из возможных источников лактоферрина может стать молочная сыворотка, которая сейчас зачастую является отходом молочного производства. Получение лактоферрина из молочной сыворотки изучено на предмет влияния балластных белков сыворотки на процесс агрегации лактоферрина. Установлено, что агрегация лактоферрина усиливается в присутствии сывороточных белков, и при этом снижается его бактериостатическая активность. Кроме того, полученные при 75 °C агрегаты устойчивы к перевариванию младенцами и поэтому не усваиваются организмом [13].

С точки зрения поиска источников получения лактоферрина крайне перспективным является использование генной инженерии, причем важнейшей задачей является получение именно рекомбинантного человеческого лактоферрина, так как для решения ряда задач принципиально полное совпадение структуры белков, и бычий лактоферрин не может быть использован. Ведутся активные поиски систем для получения данного белка. Так, имеются исследования об использовании грибов рода *Aspergillus*, а также некоторых растений – сои, табака, картофеля, риса [14].

Помимо растений и грибов для получения лактоферрина успешно применяют птиц и млекопитающих. Так, российскими учеными разработан способ получения лактоферрина с использованием трансгенных коз, причем выделенный из молока таких животных лактоферрин не отличался по физиологическим свойствам от натурального белка человека [11].

Однако основной проблемой получения трансгенного лактоферрина являются крайне низкий выход продукта, сложная многоступенчатая процедура очистки.

Биологическая и фармакологическая активность лактоферрина

Исследования лактоферрина, продолжающиеся уже более шестидесяти лет, позволили накопить большой пул информации о широком спектре его фармакологической активности. Так, доказаны антибактериальные, противовирусные и противогрибковые свойства лактоферрина [15–17].

Противовирусная активность лактоферрина исследована многими учеными, причем определено несколько механизмов этой активности, а именно модулирование системы антиоксидантов, формирование иммунного ответа, прямое взаимодействие с вирусом, а также адъювантный эффект [4]. Получены результаты, свидетельствующие о противовирусной активности лактоферрина в отношении цитомегаловируса, вируса иммунодефицита человека, вируса гепатита С и В, вируса простого герпеса человека и крупного рогатого скота, ротавирусов, норовирусов [18].

Установлено, что бычий лактоферрин активен против относительно недавно обнаруженных и быстро распространяющихся вирусов Чикунгунья и Зика: он снижает возможность инфицирования на 80 %, при этом практически не обладая цитотоксичностью по отношению к клеткам организма-хозяина [19].

Исследование тайваньских ученых позволило установить, что лактоферрин в опытах *in vitro* и *in vivo* подавляет активность вируса, вызывающего лихорадку денге, причем установлено, что данный белок конкурирует с вирусом, связываясь с потенциальным рецептором вируса [20].

Целый ряд исследований посвящен противогриппозной активности лактоферрина. Изучение активности долей лактоферрина показало, что ингибирование вируса обеспечивается только С-глобулой белка, обеспечивающей инактивацию основных подтипов вируса, включая H1N1 и H3N2 подтипы. С-доля лактоферрина прочно связывается с HA(2)-областью вирусного гемагглютинаина, что приводит к ингибированию гемагглютинации вируса и инфицированию. На сегодняшний день не только установлена противогриппозная активность лактоферрина на стадии иммунного ответа, но также рассматривается возможность его использования для терапии данного заболевания [21].

Лактоферрин способен предотвратить связывание вируса гриппа с клетками-мишенями, кроме того, он принимает активное участие в создании адекватного иммунного ответа. Некоторые исследователи рекомендуют его в качестве перспективного адъюванта для создания вакцин против гриппа [4].

События последнего года, связанные с появлением новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, привели к поиску потенциальных агентов, способных участвовать в ее профилактике и/или лечении. Лактоферрин, как белок с доказанной иммуномодулирующей и противовирусной активностью, стал одним из объектов такого исследования. С начала пандемии в марте 2020 года многие ученые исследовали способность лактоферрина противостоять коронавирусу.

Так, доказано, что лактоферрин обладает противовирусной активностью в отношении близкого к SARS-CoV-2, уже известного вируса SARS-CoV. Кроме того, лактоферрин обладает уникальными иммуномодулирующими и противовоспалительными эффектами, которые могут иметь особое значение для патофизиологии тяжелых случаев COVID-19. Это дает надежду,

что лактоферрин может быть потенциальным агентом, способствующим снижению активности вируса, вызывающего столь грозное и зачастую смертельное заболевание [22].

Группой исследователей в процессе эксперимента *in vivo* установлено, что на клеточной линии эпителиальных клеток кишечника человека Caco-2 лактоферрин способен противостоять инфекции SARS-CoV-2: он значительно снижал экспрессию генов противовирусного иммунного ответа FNA1, IFNB1, TLR3, TLR7, IRF3, IRF7 и MAVS, кроме того, он частично подавлял вирус SARS-CoV-2 и его репликацию. Таким образом, лактоферрин является иммуномодулятором при формировании иммунного эффекта и обладает определенным эффектом против вируса COVID-19 [23].

Доказано, что лактоферрин подавляет рост многих патогенов с помощью таких механизмов, как разрушение клеточных мембран, ингибирование адгезии микробов к клеткам-хозяевам и предотвращение образования биопленок [24].

Одним из возможных механизмов, обеспечивающих антимикробный эффект лактоферрина, является его способность связывать ионы железа, тем самым ограничивая количество свободного железа, необходимого бактериям для нормальной жизнедеятельности. Таким образом, физико-химические свойства и природное сродство к ионам железа у лактоферрина обеспечивает последнему конкурентное преимущество в данной борьбе. Данное свойство лактоферрина также может способствовать при лечении COVID-19, так как его способность связывать ионы железа способствует снижению риска таких явлений, как тромбоцитопения и гиперкоагуляция, зачастую приводящих к смерти пациента с коронавирусной инфекцией [6].

Лактоферрин регулирует всасываемость железа в кишечнике, а также способен прямо или опосредованно хелатировать железо [25].

Лактоферрин, как известно, активно продуцируется не только молочными железами, он, например, является важнейшим компонентом секрета влагалища. Помимо проявления противомикробных, противогрибковых и противовирусных свойств, лактоферрин выступает также в качестве модулятора воспаления и биомаркера. Так, установлено, что его содержание в секрете влагалища значительно увеличивается в присутствии такой патогенной флоры, как *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, and *Trichomonas vaginalis*, запуская иммунный ответ организма [26].

Противогрибковое действие лактоферрина подтверждено в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida* и *Aspergillus*. Кроме того, установлено, что при совместном использовании лактоферрина с основными противогрибковыми препаратами (флуконазол, клотримазол, кетоконазол, амфотерицин и другие) наблюдался синергизм их действия [27, 28].

Лактоферрин обладает также ярко выраженной противовоспалительной активностью – он обладает активностью против интерлейкинов-6 (IL-6). Противо-

воспалительные свойства связаны с также со способностью данного белка связывать ионы железа – он снижает внутри клеток организма содержание избыточного содержания железа, повышенное содержание которого может привести к чрезмерной восприимчивости к различным инфекциям. Доказано, что в организме беременных женщин, страдающих анемией воспаления – одним из наиболее часто встречающихся гематологических неспецифических расстройств – после перорального и интравагинального применения лактоферрина снижается уровень интерлейкина-6, улучшаются гематологические параметры, что способствует предотвращению преждевременных родов и риска возникновения восходящего воспаления [29].

Лактоферрин играет ведущую роль в формировании иммунитета у новорожденных, что обеспечивает их защиту от большинства инфекций, способствует созреванию врожденного и формированию прижизненного иммунитета младенца. Кроме того, доказана позитивная роль лактоферрина в профилактике сепсиса и некротического колита у новорожденных при использовании его в качестве добавки к питанию [30, 31].

В последние годы все больше исследователей обращают внимание на возможность использования лактоферрина в качестве биомаркера [26]. Показано, что пониженный уровень его в слюне может быть вероятным биомаркером накопления бета-амилоида в мозге при болезни Альцгеймера [32].

Исследования ранней диагностики когнитивных расстройств, проведенные на группах пациентов с болезнью Альцгеймера и легкими когнитивными расстройствами, показали статистически достоверные результаты по сравнению с группой здоровых людей. Использование лактоферрина слюны в качестве биомаркера позволяет отличить больных людей с точностью, превышающей известные биомаркеры спинномозговой жидкости, что позволяет рекомендовать его в этом качестве при обследовании населения на предмет выявления лиц с очень ранними стадиями болезни Альцгеймера [33].

Отдельным вопросом для изучения стала противоопухолевая активность лактоферрина. До конца механизм противоопухолевого действия лактоферрина не изучен, однако имеются сведения о иммуномодулирующем начале, активации собственных клеток-киллеров, а также о способности лактоферрина вызывать апоптоз и ингибировать пролиферацию опухолевых клеток [34].

Так, доказано, что лактоферрин ингибирует увеличение твердых опухолей и снижает развитие метастазов у экспериментальных животных [35]. Кроме того, установлено, что помимо прямого противоопухолевого действия, лактоферрин способен снижать иммуносупрессорную активность противоопухолевых препаратов [36].

При местном применении лактоферрина в виде геля происходит восстановление костной ткани подопытных животных, регенерация костей протекает бо-

лее быстро. Данный факт может быть использован в перспективе при разработке лекарственных препаратов для восстановления костной ткани [37].

Многолетние исследования физико-химических и биологических свойств лактоферрина позволили установить, что данный белок является идеальным наноносителем для некоторых гидрофобных терапевтических средств в связи с наличием активного целевого потенциала и сверхэкспрессии его рецептора на поверхности многих клеток. Основное преимущество лактоферрина как потенциального носителя лекарственных веществ заключается в том, что он является эндогенным белком, поэтому риск появления аллергических реакций на него минимален [38].

Было показано, что он является потенциальным кандидатом для обеспечения специфической доставки лекарств при лечении опухолей головного мозга благодаря способности преодолевать гематоэнцефалический барьер. Таким образом, лактоферрин весьма перспективен для применения в терапии рака методами наномедицины [39].

Так, разработаны мезопористые наночастицы на основе диоксида кремния и лактоферрина для адресной доставки противоопухолевых лекарственных средств пеметрекседа и эллаговой кислоты при лечении рака молочной железы. Использование лактоферрина в нанокапсулах целесообразно, так как он запускает сигнальные пути и, следовательно, опосредованно участвует в преодолении лекарственной устойчивости опухолевых клеток и снижении системного токсического действия цитостатиков [36, 40].

Помимо применения в онкологической нанотерапии, лактоферрин активно исследуется и применяется в качестве носителя для доставки лекарственных веществ для лечения болезней Паркинсона и Альцгеймера, а также противовирусных препаратов, иммуномодуляторов и для решения задач костной инженерии [38].

Ведутся разработки в области использования комплексов лактоферрина с биополимерами, которые возможно использовать в качестве носителей лекарственных средств для приема *per os* в качестве нутрицевтиков и лекарственных препаратов. Кроме того, лактоферрин можно использовать в качестве действующего и вспомогательного вещества, обеспечивающего биодоступность основного действующего вещества, а также стабильность при получении эмульсий, наночастиц или микрогелей. Для изготовления микрочастиц лактоферрина методом эмульгирования использовали хитозан и натрия альгинат, такой подход позволил добиться пролонгированного высвобождения активного компонента в течение 24 часов [18].

Применение лактоферрина в ветеринарии

Говоря о перспективах использования лактоферрина нельзя не упомянуть ветеринарную промышленность. С одной стороны, лактоферрин можно рассматривать как продукт, получаемый в агропро-

мышленном секторе, и используемый в медицинских целях, и как биологически активную добавку к пище для человека. С другой стороны, лактоферрин может и должен использоваться в ветеринарии как лекарственный препарат и нутрицевтик.

Проведено исследование возможности использования бычьего лактоферрина как потенциального лекарственного средства при борьбе с широко распространенным вирусом диареи крупного рогатого скота (семейство *Flaviviridae*), при этом лактоферрин проявлял выраженные противовирусные свойства как в начале заболевания, так и в разгар его. Кроме того, при сочетанном применении лактоферрина с другими биологически активными веществами (в частности, с низином) наблюдался выраженный синергический эффект [18].

С точки зрения физиологии образования молока у человека и крупного рогатого скота принципиальных взаимоисключающих различий нет, поэтому специфика и возможность применения лактоферрина для кормления телят с целью формирования и повышения их иммунитета, а также устойчивости к различным патогенным организмам, является актуальной и весьма понятной задачей. Именно поэтому в последние годы ведется активная работа по использованию лактоферрина в составах для кормления сельскохозяйственных животных. Особенно важным, является использование лактоферрина в питании молодняка сельскохозяйственной птицы и животных. Наряду с медицинским, педиатрическим применением этого белка целесообразно и научно обосновано использование лактоферрина в сельском хозяйстве в составе заменителей цельного молока – основного продукта, применяемого для кормления молодняка [41].

Таким образом, лактоферрин участвует во многих иммунологических процессах, задействован в механизмах как развития нервной системы, так и нейопатии, а также оказывает влияние на обмен веществ. В связи с этим весьма перспективно применение лактоферрина в качестве нутрицевтика в пищевой промышленности [42].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе анализа имеющихся сведений о широком спектре биологической активности лактоферрина, включающей антимикробную, противогрибковую, противовирусную, противоопухолевую активности.

Несомненным преимуществом лактоферрина является его особенность не разрушаться при попадании в желудочно-кишечный тракт (в отличие от большинства соединений белковой природы), что позволяет использовать его для включения в лекарственные препараты для перорального применения, а также в биологически активные добавки к пище. Благодаря этому свойству и доказанному положительному влиянию на формирование иммунитета в первые дни и недели жизни организма, лактоферрин в настоящее время весьма перспективен для применения

как в медицинской, так и ветеринарной практике как компонент питания для новорожденных детей и молодняка животных и птицы.

Кроме того, способность лактоферрина проникать через гематоэнцефалический барьер, а также высокая устойчивость его в желудочно-кишечном тракте делает его перспективным агентом в качестве наноносителя других лекарственных средств. Также перспективным является дальнейшее исследование возможности использования лактоферрина в качестве биомаркера различных заболеваний.

Таким образом, перспективным является разработка составов с лактоферрином, направленных на иммунокоррекцию, повышение жизненного тонуса, в том числе в виде биологически активных добавок к пище как для человека, так и для животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гудок А. А., Дейкин А. В. Лактоферрин – перспективы использования в пищевой, фармацевтической и сельскохозяйственной промышленности. *Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства*. 2016;1(9):421–424.
2. Никишина И. Н., Симоненко С. В. Полифункциональная наночастица лактоферрин. *Пищевая промышленность*. 2010;2: 10–11.
3. Arcella A., Oliva M. A., Staffieri S., Alberti S., Grillea G., Madonna M., Bartolo M., Pavone L., Giangaspero F., Cantore G., Frati A. In vitro and in vivo effect of human lactoferrin on glioblastoma growth. *J. Neurosurg*. 2015;123:1026–1035. DOI: 10.3171/2014.12.jns14512.
4. Зорина В. Н. Структура и ингибирующая активность лактоферрина по отношению к вирусу гриппа. *Инфекция и иммунитет*. 2020;1:49–54. DOI: 10.15789/2220-7619-POL-1156.
5. Тиллиб С. В., Привезенцева М. Э., Иванова Т. И., Васильев Л. А., Гурский Я. Г., Гольдман И. Л., Садчикова Е. Р., Георгиев Г. П. Способ разделения лактоферринов человека и козы с помощью дифференциальной иммуноаффинной хроматографии с использованием однодоменных мини-антител. Патент РФ на изобретение № 2553515. 20.06.2015. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2553515C1/ru>. Ссылка активна на 19.09.2021.
6. Kell D. B., Heyden E. L., Pretorius E. The biology of lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1221. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01221.
7. Wang B., Timilsena Y. P., Blanch E., Adhikari B. Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2019;59(4):580–596. DOI:10.1080/10408398.2017.1381583
8. Mayayo C., Montserrat M., Ramos S. J., Martínez-Lorenzo M. J., Calvo M., Sánchez L., Pérez M. D. Kinetic parameters for high-pressure-induced denaturation of lactoferrin in human milk. *International Dairy Journal*. 2014;39(2):246–252. DOI: 10.1016/j.idairyj.2014.07.001.
9. Wakabayashi H., Yamauchi K., Abe F. Quality control of commercial bovine lactoferrin. *Biometals*. 2018;31(3):313–319. DOI: 10.1007/s10534-018-0098-2.
10. Гольдман И. Л., Майзель С. Г., Садчикова Е. Р., Шехватова Г. В., Пехотин И. Ю., Зокин А. А., Зобнин Д. Б., Маркин Э. В., Панферов А. В. Способ выделения и очистки лактоферрина из молочного сырья. Патент РФ на изобретение № 2634859. 07.11.2017. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2634859C1/ru>. Ссылка активна на 19.09.2021.
11. Gudok A. A., Deykin A. V. Lactoferrin – use prospects and analysis of actual results. *Russian Scientist*. 2017;1(1):3–12.
12. Wang Q., Chen G. Q., Kentish S. E. Isolation of lactoferrin and immunoglobulins from dairy whey by an electrodialysis with filtration membrane process. *Separation and Purification Technology*. 2020;233:115987. DOI: 10.1016/j.seppur.2019.115987.

13. Xiong L., Boeren S., Vervoort J., Hettinga K. Effect of milk serum proteins on aggregation, bacteriostatic activity and digestion of lactoferrin after heat treatment. *Food Chemistry*. 2021;337: 127973. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127973.
14. Трубицина Т.П., Колоскова Е.М., Езерский В.А., Максименко С.В., Белова Н.В., Кутин И.В., Рябых В.П. Проблемы и перспективы использования рекомбинантного лактоферрина человека и его производных. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2018;4:5–26.
15. Бухарин О.В., Вальшев А.В., Вальшева И.В. Роль лактоферрина в противомикробной защите. *Успехи современной биологии*. 2011;131(2):135–144.
16. Chen P. W., Jheng T. T., Shyu C. L., Mao F. C. Antimicrobial potential for the combination of bovine lactoferrin or its hydrolysate with lactoferrin-resistant probiotics against foodborne pathogens. *J Dairy Sci*. 2013;96(3):1438–1446. DOI: 10.3168/jds.2012-6112.
17. Зорина В.Н., Воробьева О.Н., Зорин Н.А. Активность лактоферрина различного происхождения в отношении грамположительных кокков и *Candida albicans*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2018;2:54–58. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-2-54-58.
18. Małaczewska J., Kaczorek-Lukowska E., Wójcik R., Siwicki A. Antiviral effects of nisin, lysozyme, lactoferrin and their mixtures against bovine viral diarrhoea virus. *BMC veterinary research*. 2019;15(1):1–12. DOI: 10.1186/s12917-019-2067-6.
19. Carvalho C. A. M., Casseb S. M. M., Gonçalves R. B. J., Silva E. V., Gomes A. M., Vasconcelos P. F. Bovine lactoferrin activity against Chikungunya and Zika viruses. *Gen. Virol.* 2017;98(7):1749–1754. DOI: 10.1099/jgv.0.000849.
20. Chen J. M., Fan Y. C., Lin J. W., Chen Y. Y., Hsu W. L., Chiou S. S. Bovine lactoferrin inhibits dengue virus infectivity by interacting with heparan sulfate, low-density lipoprotein receptor, and DC-SIGN. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(9):E1957. DOI: 10.3390/ijms18091957.
21. Ammendolia M. G., Agamennone M., Pietrantonio A., Lannutti F., Siciliano R. A., De Giulio B., Amici C., Superti F. Bovine lactoferrin-derived peptides as novel broad-spectrum inhibitors of influenza virus. *Pathog. Glob. Health*. 2012;106(1):12–19. DOI: 10.1179/2047773212Y.0000000004.
22. Chang R., Ng T. B., Sun W. Z. Lactoferrin as potential preventative and adjunct treatment for COVID-19. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2020;56(3):106118. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106118.
23. Salaris C., Scarpa M., Elli M., Bertolini A., Guglielmetti S., Pregliasco F., Blandizzi C., Brun P., Castagliuolo I. Protective effects of lactoferrin against SARS-CoV-2 infection in vitro. *Nutrients*. 2021;13(2):328. DOI: 10.3390/nu13020328.
24. Peroni D. G., Fanos V. Lactoferrin is an important factor when breastfeeding and COVID-19 are considered. *Acta Paediatrica*. 2020;109(10):2139–2140. DOI: 10.1111/apa.15417.
25. Hao L., Shan Q., Wei J., Ma F., Sun P. Lactoferrin: major physiological functions and applications. *Current Protein and Peptide Science*. 2019;29(2):139–144. DOI: 10.2174/1389203719666180514150921.
26. Valenti P., Rosa L., Capobianco D., Lepanto M. S., Schiavi E., Cutone A., Paesano R., Mastromarino P. Role of lactobacilli and lactoferrin in the mucosal cervicovaginal defense. *Frontiers in immunology*. 2018;9:376. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00376.
27. Fernandes K. E., Carter D. A. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:2. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00002.
28. Fernandes K. E., Weeks K., Carter D. A. Lactoferrin is broadly active against yeasts and highly synergistic with amphotericin B. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2020;64(5):e02284–19. DOI: 10.1128/aac.02284-19.
29. Rosa L., Cutone A., Lepanto M. S., Paesano R., Valent P. Lactoferrin: a natural glycoprotein involved in iron and inflammatory homeostasis. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(9): 1985. DOI: 10.3390/ijms18091985.
30. Telang S. Lactoferrin: a critical player in neonatal host defense. *Nutrients*. 2018;10(9):1228. DOI: 10.3390/nu10091228.
31. Manzoni P., Dall'Agnola A., Tomé D., Kaufman D. A., Tavella E., Pieretto M., Alessandro Messina A., De Luca D., Bellaiche M., Mosca A., Piloquet H., Simeoni U., Picaud J.-C., Del Vecchio, A. Role of lactoferrin in neonates and infants: an update. *American journal of perinatology*. 2018;35(6):561–565. DOI: 10.1089/bfm.2019.0033.
32. Olsen I., Singhrao S. K. Low levels of salivary lactoferrin may affect oral dysbiosis and contribute to Alzheimer's disease: A hypothesis. *Medical hypotheses*. 2021;146:110393. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.110393.
33. Carro E., Bartolomé F., Bermejo-Pareja F., Villarejo-Galende A., Molina J. A., Ortiz P., Calero M., Rabano A., Cantero J. L., Orive G. Early diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease based on salivary lactoferrin. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*. 2017;8:131–138. DOI: 10.1016/j.dadm.2017.04.002.
34. Chea C., Miyauchi M., Inubushi T., Ayuningtyas N. F., Subarnhesaj A., Nguyen P. T., Shrestha M., Haing S., Ohta K., Takata T. Molecular mechanism of inhibitory effects of bovine lactoferrin on the growth of oral squamous cell carcinoma. *PLoS one*. 2018;13(1):e0191683. DOI: 10.1371/journal.pone.0191683.
35. Arcella A., Oliva M. A., Staffieri S., Aalberti S., Grillea G., Madonna M., Bartolo M., Pavone L., Giangaspero F., Cantore G., Frati A. In vitro and in vivo effect of human lactoferrin on glioblastoma growth. *J. Neurosurg.* 2015;123:1026–1035. DOI: 10.3171/2014.12.jns14512.
36. Алешина Г.М. Лактоферрин – эндогенный регулятор защитных функций организма. *Медицинский академический журнал*. 2019;19(1):35–44. DOI: 10.17816/MAJ19135-44.
37. Gao R., Watson M., Callon K. E., Tuari D., Dray M., Naot D., Amirapu S., Munro J. T., Cornish J., Musson, D. S. Local application of lactoferrin promotes bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model as demonstrated by micro-CT and histological analysis. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2018;12(1):e620–e626. DOI: 10.1002/term.2348.
38. Elzoghby A. O., Abdelmoneem M. A., Hassanin I. A., Abd Elwakil M. M., Elnaggar M. A., Mokhtar S., Fang J. Y., Elkhodairy K. A. Lactoferrin, a multi-functional glycoprotein: active therapeutic, drug nanocarrier & targeting ligand. *Biomaterials*. 2020;263:120355. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120355.
39. Sabra S., Agwa M. M. Lactoferrin, a unique molecule with diverse therapeutic and nanotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;164:1046–1060. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.167.
40. Ali O. M., Bekhit A. A., Khattab S. N., Helmy M. W., Abdel-Ghany Y. S., Teleb M., Elzoghby A. O. Synthesis of lactoferrin mesoporous silica nanoparticles for pemetrexed/ellagic acid synergistic breast cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020;188:110824. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.110824.
41. Борисов Н. Заменители цельного молока для телят: использовать или нет? *Эффективное животноводство*. 2021;2(168):79–85.
42. Iglesias-Figuerola B. F., Espinoza-Sánchez E. A., Siqueiros-Cendón T. S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin as a nutraceutical protein from milk, an overview. *International dairy journal*. 2019;89:37–41. DOI: 10.1016/j.idairyj.2018.09.004.

REFERENCES

1. Gudok A. A., Deykin A. V. Lactoferrin – prospects for use in food, pharmaceutical and agricultural industries. *Sbornik nauchnykh trudov Vserossiyskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta ovtsevodstva i kozovodstva*. 2016;1(9):421–424. (In Russ.)
2. Nikishina I. N., Simonenko S. V. Polyfunctional nanoparticle lactoferrin. *Pishchevaya promyshlennost' = Food Industry*. 2010;2:10–11. (In Russ.)
3. Arcella A., Oliva M. A., Staffieri S., Alberti S., Grillea G., Madonna M., Bartolo M., Pavone L., Giangaspero F., Cantore G., Frati A. In vitro and in vivo effect of human lactoferrin on glioblastoma growth. *J. Neurosurg.* 2015;123:1026–1035. DOI: 10.3171/2014.12.jns14512.
4. Zorina V. N. Pattern of lactoferrin anti-influenza virus inhibitory activity. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2020;1:49–54. (In Russ.) DOI: 10.15789/2220-7619-POL-1156.
5. Tillib S. V., Privezentseva M. E., Ivanova T. I., Vasil'ev L. A., Gurskiy Ya. G., Gol'dman I. L., Sadchikova E. R., Georgiev G. P. *Sposob razdeleniya laktoferriinov cheloveka i kozy s pomoshch'yu differentsial'noy immunoaffinnoy khromatografii s ispol'zovaniem odnodomennykh mini-antitel* [Method of separating lactoferrin of human and goat by means of differential immunoaffinity chromatography using single-domain mini-antibodies]. Patent RU № 2553515. 20.06.2015. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU2553515C1/ru>. Accessed: 19.09.2021. (In Russ.)

6. Kell D. B., Heyden E. L., Pretorius E. The biology of lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1221. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01221.
7. Wang B., Timilsena Y. P., Blanch E., Adhikari B. Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2019;59(4):580–596. DOI:10.1080/10408398.2017.1381583
8. Mayayo C., Montserrat M., Ramos S. J., Martínez-Lorenzo M. J., Calvo M., Sánchez L., Pérez M. D. Kinetic parameters for high-pressure-induced denaturation of lactoferrin in human milk. *International Dairy Journal*. 2014;39(2):246–252. DOI: 10.1016/j.idairyj.2014.07.001.
9. Wakabayashi H., Yamauchi K., Abe F. Quality control of commercial bovine lactoferrin. *Biomaterials*. 2018;31(3):313–319. DOI: 10.1007/s10534-018-0098-2.
10. Gol'dman I. L., Mayzel' S. G., Sadchikova E. R., Shekhvatova G. V., Pekhotin I. Yu., Zokin A. A., Zobnin D. B., Markin E. V., Panferov A. V., *Sposob vydeleniya i ochistki laktoferrina iz molochnogo syr'ya* [Method for lactoferrin isolation and purification from dairy raw materials]. Patent RUS № 2634859. 07.11.2017. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU2634859C1/ru>. Accessed: 19.09.2021. (In Russ.)
11. Gudok A. A., Deykin A. V. Lactoferrin – use prospects and analysis of actual results. *Russian Scientist*. 2017;1(1):3–12.
12. Wang Q., Chen G. Q., Kentish S. E. Isolation of lactoferrin and immunoglobulins from dairy whey by an electrodialysis with filtration membrane process. *Separation and Purification Technology*. 2020;233:115987. DOI: 10.1016/j.seppur.2019.115987.
13. Xiong L., Boeren S., Vervoort J., Hettinga K. Effect of milk serum proteins on aggregation, bacteriostatic activity and digestion of lactoferrin after heat treatment. *Food Chemistry*. 2021;337:127973. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127973.
14. Trubitsina T. P., Koloskova E. M., Ezerskiy V. A., Maksimenko S. V., Belova N. V., Kut'in I. V., Ryabykh V. P. Problems and prospects of using recombinant human lactoferrin and its derivatives. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh = Problems of Productive Animal Biology*. 2018;4:5–26. (In Russ.)
15. Bukharin O. V., Valyshev A. V., Valysheva I. V. The role of lactoferrin in anti-infective protection. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*. 2011;131(2):135–144. (In Russ.)
16. Chen P. W., Jheng T. T., Shyu C. L., Mao F. C. Antimicrobial potential for the combination of bovine lactoferrin or its hydrolysate with lactoferrin-resistant probiotics against foodborne pathogens. *J Dairy Sci*. 2013;96(3):1438–1446. DOI: 10.3168/jds.2012-6112.
17. Zorina V. N., Vorobeva O. N., Zorin N. A. Antimicrobial activity of the human and bovine lactoferrin against gram-positive bacteria and *Candida albicans*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018;2:54–58. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-2-54-58. (In Russ.)
18. Małaczewska J., Kaczorek-Łukowska E., Wójcik R., Siwicki A. Antiviral effects of nisin, lysozyme, lactoferrin and their mixtures against bovine viral diarrhoea virus. *BMC veterinary research*. 2019;15(1):1–12. DOI: 10.1186/s12917-019-2067-6.
19. Carvalho C. A. M., Cassele S. M. M., Gonçalves R. B. J., Silva E. V., Gomes A. M., Vasconcelos P. F. Bovine lactoferrin activity against Chikungunya and Zika viruses. *Gen. Virol.* 2017;98(7):1749–1754. DOI: 10.1099/jgv.0.000849.
20. Chen J. M., Fan Y. C., Lin J. W., Chen Y. Y., Hsu W. L., Chiou S. S. Bovine lactoferrin inhibits dengue virus infectivity by interacting with heparan sulfate, low-density lipoprotein receptor, and DC-SIGN. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(9):E1957. DOI: 10.3390/ijms18091957.
21. Ammendolia M. G., Agamennone M., Pietrantoni A., Lannutti F., Siciliano R. A., De Giulio B., Amici C., Superti F. Bovine lactoferrin-derived peptides as novel broad-spectrum inhibitors of influenza virus. *Pathog. Glob. Health*. 2012;106(1):12–19. DOI: 10.1179/2047773212Y.0000000004.
22. Chang R., Ng T. B., Sun W. Z. Lactoferrin as potential preventative and adjunct treatment for COVID-19. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2020;56(3):106118. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106118.
23. Salaris C., Scarpa M., Elli M., Bertolini A., Guglielmetti S., Pregliasco F., Blandizzi C., Brun P., Castagliuolo I. Protective effects of lactoferrin against SARS-CoV-2 infection in vitro. *Nutrients*. 2021;13(2):328. DOI: 10.3390/nu13020328.
24. Peroni D. G., Fanos V. Lactoferrin is an important factor when breastfeeding and COVID-19 are considered. *Acta Paediatrica*. 2020;109(10):2139–2140. DOI: 10.1111/apa.15417.
25. Hao L., Shan Q., Wei J., Ma F., Sun P. Lactoferrin: major physiological functions and applications. *Current Protein and Peptide Science*. 2019;29(2):139–144. DOI: 10.2174/1389203719666180514150921.
26. Valenti P., Rosa L., Capobianco D., Lepanto M. S., Schiavi E., Cutone A., Paesano R., Mastromarino P. Role of lactobacilli and lactoferrin in the mucosal cervicovaginal defense. *Frontiers in immunology*. 2018;9:376. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00376.
27. Fernandes K. E., Carter D. A. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:2. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00002.
28. Fernandes K. E., Weeks K., Carter D. A. Lactoferrin is broadly active against yeasts and highly synergistic with amphotericin B. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2020;64(5):e02284–19. DOI: 10.1128/aac.02284-19.
29. Rosa L., Cutone A., Lepanto M. S., Paesano R., Valent P. Lactoferrin: a natural glycoprotein involved in iron and inflammatory homeostasis. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(9):1985. DOI: 10.3390/ijms18091985.
30. Telang S. Lactoferrin: a critical player in neonatal host defense. *Nutrients*. 2018;10(9):1228. DOI: 10.3390/nu10091228.
31. Manzoni P., Dall'Agnola A., Tomé D., Kaufman D. A., Tavella E., Pieretto M., Alessandro Messina A., De Luca D., Bellaiche M., Mosca A., Piloquet H., Simeoni U., Picaud J.-C., Del Vecchio, A. Role of lactoferrin in neonates and infants: an update. *American journal of perinatology*. 2018;35(6):561–565. DOI: 10.1089/bfm.2019.0033.
32. Olsen I., Singhrao S. K. Low levels of salivary lactoferrin may affect oral dysbiosis and contribute to Alzheimer's disease: A hypothesis. *Medical hypotheses*. 2021;146:110393. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.110393.
33. Carro E., Bartolomé F., Bermejo-Pareja F., Villarejo-Galende A., Molina J. A., Ortiz P., Calero M., Rabano A., Cantero J. L., Orive G. Early diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease based on salivary lactoferrin. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*. 2017;8:131–138. DOI: 10.1016/j.dadm.2017.04.002.
34. Chea C., Miyauchi M., Inubushi T., Ayuningtyas N. F., Subarnhesaj A., Nguyen P. T., Shrestha M., Haing S., Ohta K., Takata T. Molecular mechanism of inhibitory effects of bovine lactoferrin on the growth of oral squamous cell carcinoma. *PLoS one*. 2018;13(1):e0191683. DOI: 10.1371/journal.pone.0191683.
35. Arcella A., Oliva M. A., Staffieri S., Aalberti S., Grillea G., Madonna M., Bartolo M., Pavone L., Giangaspero F., Cantore G., Frati A. In vitro and in vivo effect of human lactoferrin on glioblastoma growth. *J. Neurosurg*. 2015;123:1026–1035. DOI: 10.3171/2014.12.jns14512.
36. Aleshina G. M. Lactoferrin – an endogenous regulator of the protective functions of the organism. *Meditinskiy Akademicheskij zhurnal = Medical Academic Journal*. 2019;19(1):35–44. (In Russ.) DOI: 10.17816/MAJ19135-44.
37. Gao R., Watson M., Callon K. E., Tuari D., Dray M., Naot D., Amirapu S., Munro J. T., Cornish J., Musson, D. S. Local application of lactoferrin promotes bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model as demonstrated by micro-CT and histological analysis. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2018;12(1):e620–e626. DOI: 10.1002/term.2348.
38. Elzoghby A. O., Abdelmoneem M. A., Hassanin I. A., Abd Elwakil M. M., Elnaggar M. A., Mokhtar S., Fang J. Y., Elkhodairy K. A. Lactoferrin, a multi-functional glycoprotein: active therapeutic, drug nanocarrier & targeting ligand. *Biomaterials*. 2020;263:120355. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120355.
39. Sabra S., Agwa M. M. Lactoferrin, a unique molecule with diverse therapeutic and nanotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;164:1046–1060. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.167.
40. Ali O. M., Bekhit A. A., Khattab S. N., Helmy M. W., Abdel-Ghany Y. S., Teieb M., Elzoghby A. O. Synthesis of lactoferrin mesoporous silica nanoparticles for pemetrexed/ellagic acid synergistic breast cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020;188:110824. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.110824.
41. Borisov N. Whole milk substitutes for calves: use them or not? *Effektivnoe zhivotnovodstvo*. 2021;2(168):79–85. (In Russ.)
42. Iglesias-Figueroa B. F., Espinoza-Sánchez E. A., Siqueiros-Cendón T. S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin as a nutraceutical protein from milk, an overview. *International dairy journal*. 2019;89:37–41. DOI: 10.1016/j.idairyj.2018.09.004.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-40-49>
УДК 544.165



Оригинальная статья / Research article

Синтез *N*-ацилфенилацетамидов и *N*-ацил- β -кетоамидов и их влияние на ЦНС

И. П. Кодониди, Д. С. Аненко*, Д. И. Поздняков

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПМФИ – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России), 357532, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, д. 11

*Контактное лицо: Аненко Денис С. E-mail: anencko@gmail.com

ORCID: И. П. Кодониди – <https://orcid.org/0000-0003-1333-3472>; Д. С. Аненко – <https://orcid.org/0000-0003-0566-1134>; Д. И. Поздняков – <https://orcid.org/0000-0003-0889-7855>.

Статья поступила: 18.10.2021

Статья принята в печать: 13.01.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Одним из перспективных направлений поиска биологически активных соединений является молекулярное конструирование биологически активных соединений, содержащих заведомо значимый фармакоформный фрагмент. В данной статье в качестве центроида (scaffold) для поиска биологически активных соединений рассматриваются производные фенилуксусной кислоты. Однако особый интерес представляет производное фенилацетамид, его фрагмент входит в строение препарата атенолола. Оптимизация методов синтеза *N*-ацилфенилацетамидов и *N*-ацил- β -кетоамидов позволит расширить границы молекулярного конструирования и целенаправленного синтеза биологически активных веществ, содержащих в качестве центроида фрагмент фенилуксусной кислоты.

Цель. Оптимизировать методы синтеза *N*-ацилфенилацетамидов и *N*-ацил- β -кетоамидов и выявить фармакологическое влияние синтезированных соединений на ЦНС.

Материалы и методы. Получение целевых *N*-ацилфенилацетамидов осуществлялось путем взаимодействия 2-фенилацетамида с ангидридами карбоновых кислот в условиях кислотного катализа. Следующим этапом синтеза являлось получение *N*-ацил- β -кетоамидов взаимодействием синтезированных *N*-ацилфенилацетамидов с ангидридами карбоновых кислот в присутствии катализатора трифторида бора диацетата. Строение полученных соединений подтверждено ИК-, ¹H ЯМР-спектроскопией. Индивидуальность и чистоту полученных соединений контролировали тонкослойной хроматографией. Исследование синтезированных соединений на ЦНС осуществлялось в тестах «УРПИ», «ТЭИ» и «Водный лабиринт Морриса».

Результаты и обсуждение. В результате исследования синтезированы *N*-ацилфенилацетамиды и *N*-ацил- β -кетоамиды. Суть оптимизации методики синтеза *N*-ацилфенилацетамидов является в замене хлорной 65 % на концентрированную серную кислоту. В ¹H ЯМР-спектрах, подтверждающих структуры синтезированных соединений выявлены важные характерные признаки для *N*-ацетил-3-оксо-2-фенилпентанамида (VI) и *N*-ацетил-3-оксо-2-фенилгексанамида (VIII), содержащие хиральный центр. Полученные вещества обладают выраженным влиянием на ЦНС, их ноотропная активность заключается в уменьшении выраженности сенсомоторных нарушений у животных. В результате исследования выявлены соединения-лидеры, превосходящие действие препарата сравнения пирасетам.

Заключение. Осуществлённое исследование подтверждает целесообразность поиска высокоэффективных и безопасных ноотропных средств в ряду ацилированных производных амида фенилуксусной кислоты.

Ключевые слова: *N*-ацилфенилацетамиды, *N*-ацил- β -кетоамиды, пиримидин-4(1*H*)-оны, ноотропная активность, хиральный центр, диастеротопные протоны, пирасетам

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. И. П. Кодониди осуществил дизайн исследования и обсуждение синтетического эксперимента. Д. С. Аненко синтезировал соединения и подтвердил строение синтезированных структур. Д. И. Поздняков изучил фармакологическое действие исследуемых веществ на ЦНС. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Кодониди И. П., Аненко Д. С., Поздняков Д. И. Синтез *N*-ацилфенилацетамидов и *N*-ацил- β -кетоамидов и их влияние на ЦНС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):40–49. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-40-49>

Synthesis and Action of *N*-acylphenylacetamides and *N*-acyl- β -ketoamides on the Central Nervous System

Ivan P. Kodonidi, Denis S. Anenko*, Dmitriy I. Pozdnyakov

Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, 11, Kalinina av., Pyatigorsk, 357532, Russia

*Corresponding author: Denis S. Anenko. E-mail: anencko@gmail.com

ORCID: Ivan P. Kodonidi – <https://orcid.org/0000-0003-1333-3472>; Denis S. Anenko – <https://orcid.org/0000-0003-0566-1134>; Dmitriy I. Pozdnyakov – <https://orcid.org/0000-0003-0889-7855>.

Received: 18.10.2021

Revised: 13.01.2022

Published: 25.02.2022

Abstract

Introduction. One of the most promising directions in the search for biologically active compounds is the molecular design of biologically active compounds containing a known pharmacophore fragment. In this article, phenylacetic acid derivatives are considered as a scaffold for the search for biologically active compounds. However, the phenylacetamide derivative is of particular interest, its fragment is included in the structure of the atenolol drug. Optimization of methods for the synthesis of *N*-acylphenylacetamides and *N*-acyl- β -ketoamides will expand the boundaries of molecular design and targeted synthesis of biologically active substances containing a phenylacetic acid fragment as a centroid.

© Кодониди И. П., Аненко Д. С., Поздняков Д. И., 2022

© Kodonidi I. P., Anenko D. S., Pozdnyakov D. I., 2022

Aim. Obtain *N*-acylphenylacetamides and *N*-acyl- β -ketoamides, optimize the synthesis and isolation methods, and establish the degree of manifestation of the psychotropic activity of the compounds.

Materials and methods. Obtaining the target *N*-acylphenylacetamides was carried out by the interaction of 2-phenylacetamide with carboxylic acid anhydrides under conditions of acid catalysis. The next stage of the synthesis was the preparation of *N*-acyl- β -ketoamides by the interaction of the synthesized *N*-acylphenylacetamides with carboxylic acid anhydrides in the proposed catalyst for boron trifluoride diacetate. The structure of the compounds was confirmed by IR, ^1H NMR spectrometry. The individuality and purity of the obtained compounds were monitored by thin layer chromatography. The study of the synthesized compounds on the central nervous system was carried out in the tests "Conditioned reflex of passive avoidance – CPAR", "Extrapolation escape (ETI)", "Morris water maze" and "Beam Walking".

Results and discussion. As a result of the research, *N*-acylphenylacetamides and *N*-acyl- β -ketoamides were synthesized. The essence of the optimization of the procedure for the synthesis of *N*-acylphenylacetamides is to replace chloric 65 % with concentrated sulfuric acid. The ^1H NMR spectra confirming the structures of the synthesized compounds revealed important characteristic features for *N*-acetyl-3-oxo-2-phenylpentanamide (**VI**) and *N*-acetyl-3-oxo-2-phenylhexanamide (**VIII**) containing a chiral center. The resulting substances have a pronounced effect on the central nervous system, their nootropic activity is to reduce the severity of sensorimotor disorders in animals. As a result of the study, the leading compounds were identified, superior to the effect of the reference drug piracetam.

Conclusion. The carried out research confirms the expediency of searching for highly effective and safe nootropic agents in the series of acylated derivatives of phenylacetic acid amide.

Keywords: *N*-acylphenylacetamides, *N*-acyl- β -ketoamides, pyrimidin-4(1*H*)-one, nootropic activity, chiral center, diastereotopic protons, piracetam

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Ivan P. Kodonidi carried out the study design and discussion of the synthetic experiment. Denis S. Anenko synthesized compounds and established the structure of structures. Dmitriy I. Pozdnyakov made an assessment of the pharmacological activity of the investigated substances on the central nervous system. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

For citation: Kodonidi I. P., Anenko D. S., Pozdnyakov D. I. Synthesis and action of *N*-acylphenylacetamides and *N*-acyl- β -ketoamides on the central nervous system. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):40–49. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-40-49>

СОКРАЩЕНИЯ

ЦНС – центральная нервная система; УРПИ – условная реакция пассивного избегания; ТЭИ – тест экстраполяционного избегания; ИК-спектр – инфракрасный спектр; ^1H ЯМР-спектр – спектр протонного магнитного резонанса; группа ЛО – группа ложноперированных животных; группа НК – группа негативного контроля; $M \pm SEM$ – среднее арифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка среднего значения; MW – молекулярная масса; MLOGP/WLOGP/XLOGP – алгоритмы расчета логарифма коэффициента н-октанол – вода; NHD – количество доноров водородной связи; NHA – количество акцепторов водородной связи; TPSA – площадь полярной поверхности; NA – количество атомов; NRB – количество вращающихся связей; MR – молекулярная рефракция; NG – количество гетероатомов; NR – количество колец; NCA – количество углеродных атомов.

ВВЕДЕНИЕ

Известен ряд лекарственных средств, содержащих субструктурным фрагментом фенилуксусную кислоту, являющуюся перспективным центроидом для конструирования биологически активных соединений [1]. Особый интерес для наших исследований

представляет амид фенилуксусной кислоты, который входит в виде субструктуры в строение препарата атенолола [2] и, обладая значительной гидрофильностью, плохо проникает через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [3]. Можно предположить, что для *N*-ацилфенилацетамидов и *N*-ацил- β -кетоамидов, будет характерно увеличение липофильных свойств вследствие снижения полярности молекул. Это должно привести к улучшению прохождения через ГЭБ и проявлению более выраженного влияния на ЦНС. *N*-ацилфенилацетамиды и *N*-ацил- β -кетоамиды используются в синтезе труднодоступных производных пиридин-4(1*H*)-онов, обладающих церебропротекторной [4], противовоспалительной [5] и другими видами биологической активности [6–9]. Соответственно представлялось интересным предположить их влияние на центральную нервную систему, а также выявить ноотропные и церебропротекторные свойства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Прогностическая часть

Молекулярные дескрипторы правил лекарственного подобия Липински, Ghose, Veber, Egan и Muegge были рассчитаны посредством веб-сервиса SwissADME.

Синтетическая часть

Чистоту полученных веществ подтверждали методом тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil. В качестве подвижной фазы использовали хроматографическую систему *n*-бутанол – уксусная кислота – вода 4:1:2. Пятна веществ детектировали в УФ-свете. Определение температуры плавления проводили на приборе ПТП(М) ТУ 92-891. УФ-спектры фиксировали на приборе СФ-2000 (ЗАО «ОКБ СПЕКТР», Россия), растворитель этанол. ИК-спектры регистрировали на приборе ИК-Фурье спектрометре ФСМ 1201 в виде суспензии в вазелиновом масле, спектры ^1H ЯМР – на приборе Bruker с рабочей частотой 400 МГц в $\text{DMSO}-d_6$ и CDCl_3 с использованием растворителя в качестве внутреннего стандарта.

Общая методика синтеза

N-ацилфенилацетамидов (I–IV)

13,5 г (0,1 моль) 2-фенилацетамида растворяли в 0,2 моль соответствующего ангидрида при медленном добавлении в течение 2 минут по каплям концентрированной серной кислоты и нагревали в течение 1,5–2 часов при температуре 70–80 °С. Раствор охлаждали до комнатной температуры. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали дистиллированной водой 3 раза и сушили. Очищенный продукт получали перекристаллизацией из смеси бензола и петролейного эфира в соотношении 9:1.

N-ацетил-2-фенилацетамид (I)

Белые кристаллы. Выход: 87 %. Т. пл. 127–129 °С. Растворим в бензоле, малорастворим в петролейном эфире, практически нерастворим в воде. УФ-спектр, λ_{max} , нм: 203. ИК-спектр, ν , см^{-1} : 3260, 1727. Спектр ^1H ЯМР (400 МГц), δ , м.д. в $\text{DMSO}-d_6$: 2,17 (с, 3H, CH_3); 3,76 (с, 2H, CH_2); 7,23–7,37 (м, 5H, Ar); 10,82 (с, 1H, NH). R_f 0,79.

N-(2-фенилацетил)пропанамид (II)

Белые кристаллы. Выход: 84 %. Т. пл. 135–137 °С. Растворим в бензоле, малорастворим в петролейном эфире, практически нерастворим в воде. УФ-спектр, λ_{max} , нм: 203. ИК-спектр, ν , см^{-1} : 3260, 1730. Спектр ^1H ЯМР (400 МГц), δ , м.д. в CDCl_3 : 1,14–1,18 (т, 3H, CH_3); 2,69–2,75 (кв, 2H, CH_2); 3,87 (с, 2H, CH_2); 7,28–7,39 (м, 5H, Ar); 8,66 (с, 1H, NH). R_f 0,81.

N-(2-фенилацетил)бутанамид (III)

Белые кристаллы. Выход: 80 %. Т. пл. 121–123 °С. Растворим в бензоле, малорастворим в петролейном эфире, практически нерастворим в воде. УФ-спектр, λ_{max} , нм: 203. ИК-спектр, ν , см^{-1} : 3253, 1727. Спектр ^1H ЯМР (400 МГц), δ , м.д. в $\text{DMSO}-d_6$: 0,85–0,88 (т, 3H, CH_3); 1,48–1,57 (секст, 2H, CH_2); 2,44–2,48 (т, 2H, CH_2); 3,80 (с, 2H, CH_2); 7,22–7,33 (м, 5H, Ar); 10,76 (с, 1H, NH). R_f 0,86.

2-метил-*N*-(2-фенилацетил)пропанамид (IV)

Белые кристаллы. Выход: 66 %. Т. пл. 118–120 °С. Растворим в бензоле, малорастворим в петролейном эфире, практически нерастворим в воде. УФ-спектр, λ_{max} , нм: 203. ИК-спектр, ν , см^{-1} : 3267, 1730. Спектр ^1H ЯМР (400 МГц), δ , м.д. в $\text{DMSO}-d_6$: 1,03–1,05 (д, 6H, CH_3); 2,78–2,85 (дк, 3H, CH_3); 3,86 (с, 2H, CH_2); 7,22–7,33 (м, 5H, Ar); 10,73 (с, 1H, NH). R_f 0,88.

Методика синтеза

N-ацетил-3-оксо-2-фенилбутанамид (V)

К суспензии 13,5 г (0,1 моль) 2-фенилацетамида в 37,8 мл (0,4 моль) этанового ангидрида прикапывают 39,4 мл (0,283 моль) диацетат трифторида бора. Реакционную смесь выдерживают два дня и на третьи сутки выделяют целевой продукт раствором ацетата натрия, приготовленного в соотношении 13,6 г (0,1 моль) вещества на 34 мл воды. Перекристаллизация осуществляется в маточном растворе при 70 °С.

N-ацетил-3-оксо-2-фенилбутанамид (V)

Белые кристаллы. Выход: 69 %. Т. пл.: 117–119 °С. Растворим в хлороформе, этаноле, диэтиловом эфире и воде. УФ-спектр, λ_{max} , нм: 203. ИК-спектр, ν , см^{-1} : 1740, 1700, 3217. Спектр ^1H ЯМР (400 МГц), δ , м.д. в $\text{DMSO}-d_6$: 2,08 (с, 3H, CH_3); 2,11 (с, 3H, CH_3); 5,43 (с, 1H, $\text{CH}_{\text{хир.}}$); 7,24–7,39 (м, 5H, Ar); 10,99 (с, 1H, NH). R_f 0,79.

Общая методика синтеза

N-ацил- β -кетоамидов (V–IX)

К суспензии 0,1 моль *N*-ацилфенилацетамида в 0,4 моль соответствующего ангидрида прикапывают 39,4 мл (0,283 моль) диацетат трифторида бора. Реакционную смесь выдерживают в течение двух суток. На третий день при интенсивном перемешивании прикапывают раствор 3-водного ацетата натрия, приготовленного в соотношении: 13,6 г (0,1 моль) вещества на 34 мл воды. Смесь греют при 70–80 °С на водяной бане до полного растворения и оставляют в холодильнике. На следующий день образуются кристаллы соединений. Вещества фильтруют, высушивают и очищают перекристаллизацией из изооктана.

N-ацетил-3-оксо-2-фенилпентанамид (VI)

Белые с кремоватым оттенком кристаллы. Выход: 55 %. Т. пл.: 105–107 °С. Растворим в хлороформе, этаноле, диэтиловом эфире, малорастворим в воде. УФ-спектр, λ_{max} , нм: 207, 267. ИК-спектр, ν , см^{-1} : 1748, 1701, 3214. Спектр ^1H ЯМР (400 МГц), δ , м.д. в $\text{DMSO}-d_6$: 0,88–0,93 (т, 3H, CH_3); 2,15 (с, 3H, CH_3); 2,28–2,48 (м, 1H, $\text{CH}_{\text{метилен.}}$); 2,57–2,70 (м, 1H, $\text{CH}_{\text{метилен.}}$); 5,48 (с, 1H, $\text{CH}_{\text{хир.}}$); 7,26–7,44 (м, 5H, Ar); 11,02 (с, 1H, NH). R_f 0,80.

3-оксо-2-фенил-N-пропаноилбутанамид (VII)

Белые кристаллы. Выход: 61 %. Т. пл.: 53–55 °С. Растворим в хлороформе, этаноле, диэтиловом эфире, практически нерастворим в воде. УФ-спектр, λ_{max} , нм: 208, 265. ИК-спектр, ν , см⁻¹: 1745, 1702, 3267. Спектр ¹H ЯМР (400 МГц), δ , м.д. в DMSO-*d*₆: 0,97–1,01 (т, 3H, CH₃); 2,10 (с, 3H, CH₃); 2,40–2,46 (к, 2H, CH₂); 5,49 (с, 1H, CH_{хир.}), 7,25–7,40 (м, 5H, Ar); 10,96 (с, 1H, NH). R_f 0,82.

N-ацетил-3-оксо-2-фенилгексанамид (VIII)

Белые кристаллы. Выход: 66 %. Т. пл.: 79–81 °С. Растворим в хлороформе, этаноле, диэтиловом эфире, практически нерастворим в воде. УФ-спектр, λ_{max} , нм: 207, 267. ИК-спектр, ν , см⁻¹: 1741, 1700, 3208. Спектр ¹H ЯМР (400 МГц), δ , м.д. в DMSO-*d*₆: 0,70–0,74 (т, 3H, CH₃); 1,37–1,43 (м, 2H, CH₂); 2,11 (с, 3H, CH₃); 2,25–2,33 (м, 1H, CH_{метилен.}); 2,53–2,61 (м, 1H, CH_{метилен.}); 5,43 (с, 1H, CH_{хир.}); 7,23–7,39 (м, 5H, Ar); 10,98 (с, 1H, NH). R_f 0,81.

N-бутаноил-3-оксо-2-фенилбутанамид (IX)

Белые кристаллы. Выход: 31 %. Т. пл.: 96–98 °С. Растворим в хлороформе, этаноле, диэтиловом эфире, практически нерастворим в воде. УФ-спектр, λ_{max} , нм: 208, 265. ИК-спектр, ν , см⁻¹: 1750, 1709, 3273. Спектр ¹H ЯМР (400 МГц), δ , м.д. в DMSO-*d*₆: 0,85–0,89 (т, 3H, CH₃); 1,49–1,57 (м, 2H, CH₂); 2,84–2,83 (м, 2H, CH₂); 2,28–2,44 (м, 1H, CH_{метилен.}); 2,50–2,66 (м, 1H, CH_{метилен.}); 5,47 (с, 1H, CH_{хир.}); 7,27–7,43 (м, 5H, Ar); 11,02 (с, 1H, NH). R_f 0,83.

Фармакологическая часть

Исследование выполнено на крысах-самцах линии Wistar, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово». Содержание и проводимые с животными манипуляции соответствовали общепринятым нормам экспериментальной этики (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes, September 22, 2010).

Перманентную фокальную ишемию головного мозга моделировали путем необратимой правосторонней термокоагуляции средней мозговой артерии под хлоралгидратным наркозом (350 мг/кг, внутривенно) [10].

Были сформированы следующие экспериментальные группы: ложнопериованные животные (ЛО, *n* = 10), группа животных негативного контроля (НК) – с модельной патологией, но лишенная фармакологической поддержки (*n* = 10), группы крыс, которым вводили изучаемые соединения и препарат сравнения (*n* = 10 каждая группа).

Исследуемые объекты и препарат сравнения пираретам [11, 12] вводили интрагастрально в дозе 25 мг/мг и 250 мг/кг соответственно непосредственно после пробуждения животных и далее ежедневно на протяжении 3-х дней. По истечении 3-х суток

постишемического периода осуществляли оценку поведенческой активности животных в тестах «условный рефлекс пассивного избегания», «тест экстраполяционного избегания» и «водный лабиринт Морриса», дополнительно у крыс оценивали изменение сенсомоторного дефицита в тесте «Beam walking».

Тест «Условный рефлекс пассивного избегания – УРПИ» [13]

Установка состояла из 2-х смежных отсеков. Первый отсек – освещенный, а вторая секция – затемненная габаритами 15 × 15 см, снабженная электростимулирующей подложкой и соединенная с освещенной камерой лазером. Процедура тестирования: животное помещали на середину освещенной камеры, хвостом к темному отсеку и в течение 2 минут регистрировали латентный период первого захода в темный отсек, где животное получало электрошоковое раздражение (3 импульса мощностью 40 В). Перед воспроизведением ишемии головного мозга животных обучали процедуре тестирования в течении 3-х дней. Животных, не выработавших устойчивый рефлекс, исключали из эксперимента.

Тест «Экстраполяционного избегания (ТЭИ)» [13]

Экспериментальная установка представляла собой полимерный цилиндр Н, в центре цилиндра закреплен внутренний акриловый цилиндр, нижний край которого погружен в воду на глубину 2,5 см.

Процедура тестирования: животное помещали во внутренний цилиндр и регистрировали латентное время выполнения задачи (подныривание, избегание) в течение 2 минут. Перед воспроизведением ишемии головного мозга животных обучали процедуре тестирования в течении 3-х дней. Животных, не выработавших устойчивый рефлекс, исключали из эксперимента.

Тест «Водный лабиринт Морриса» [13]

Установка Водный лабиринт Морриса, предназначена для оценки сохранности памятного следа у животных и представляет собой арену с подвижной площадкой, заполненной подкрашенной водой [Установка НПК «Открытая наука», Россия]. При проведении исследования установка заполнялась до уровня 50 см. До моделирования ишемии головного мозга крыс обучали процедуре тестирования: в течении 120 сек. животными предоставлялась возможность самостоятельно найти площадку, при условии невыполнения задачи крыс перемещали на площадку на 10 сек. после чего тестирование повторяли. Животные, повторно не выполнившие задачу, исключались из эксперимента. После воспроизведения ишемии головного мозга в аналогичных условиях тест повторяли, при этом оцениваемым параметром служил латентный период достижения площадки в сек.

Тест «Beam Walking» [14]

Оценку сенсомоторного дефицита проводили на установке «Beam Walking» (НПК «Открытая наука», Россия). Установка представляла собой сужающуюся дорожку длиной 165 см. с бортами для фиксации падения конечностей животных и темной камерой в конце дорожки. Точка старта животных освещалась ярким светом, мотивируя животное двигаться к конечной цели – темной камере. Предварительно (до моделирования ишемии) животных обучали процедуре тестирования на протяжении 4 дней. После чего животных подвергали повторному тестированию с определением степени сенсомоторного дефицита, при этом регистрировалось число полных постановок конечностей на борт и количество соскальзываний. Сенсомоторный дефицит рассчитывали по формуле:

Сенсомоторный дефицит, % = (число полных

постановок конечностей на борт × 1 +

число соскальзываний × 0,5) / общее число шагов.

Результаты эксперимента обрабатывали методами вариационной статистики с применением прикладного программного пакета STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Полученные данные выражали в виде $M \pm SEM$ [15]. Сравнение групп средних осуществляли методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с post hoc тестом Ньюмена – Кеулса. Различия считались статистически значимыми при ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прогностическая часть

С целью выявления возможности использования прогнозируемых структур в качестве активной фармацевтической субстанции осуществлен анализ их молекулярных дескрипторов, полученных посредством веб-сервиса SwissADME. В таблице 1 приведены молекулярные дескрипторы, описывающие *N*-ацилфе-

нилацетамиды и *N*-ацил- β -кетоамиды согласно правилам Липински, Ghose, Veber, Egan и Muegge.

Согласно результатам, приведенным в таблице 1, практически все *N*-ацилфенилацетамиды и *N*-ацил- β -кетоамиды характеризуются высокой степенью лекарствовоподобия, так как соответствуют правилам Липински, Ghose, Veber, Egan и Muegge. Вещества **I** и **II** не соответствуют правилу Muegge по критерию молекулярной массы, так как согласно ему, она не должна быть меньше 200 г/моль.

Анализ значений коэффициента распределения н-октанол – вода (таблица 1), характеризующий липофильные свойства молекулы, позволил подтвердить наши предположения об увеличении липофильности всех прогнозируемых соединений.

Синтетическая часть

Синтез *N*-ацилфенилацетамидов осуществлялся взаимодействием 2-фенилацетамида с ангидридами карбоновых кислот [16–18] (рисунок 1).

С целью оптимизации методики синтеза *N*-ацилфенилацетамидов [18] в условиях кислотного катализа анализировались выходы целевых соединений с использованием промышленной хлорной 65 % и концентрированной серной кислот. В результате исследования выявлено, что применение серной кислоты приводит к значительному увеличению выхода *N*-ацилфенилацетамидов.

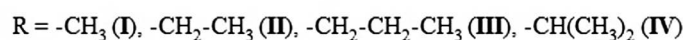
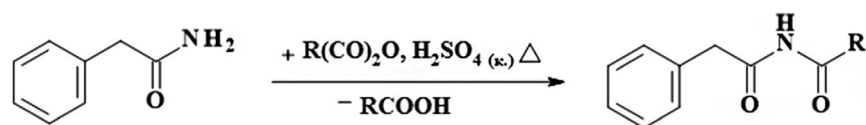
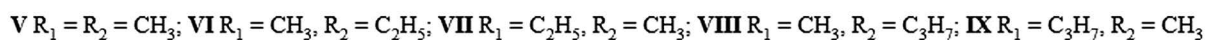
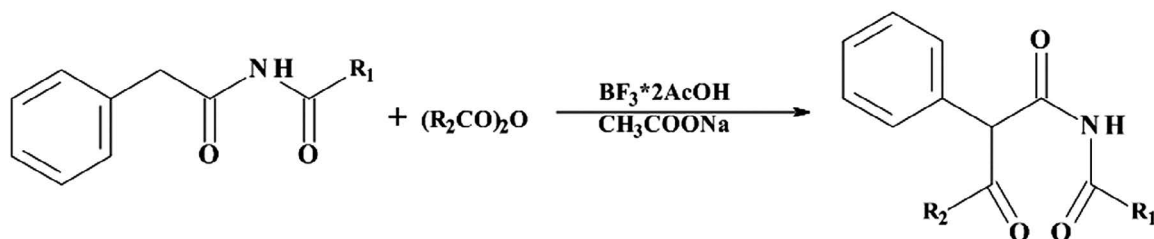
Стоит заметить, что выход 2-метил-*N*-(2-фенилацетил)пропанамида (**IV**) 66 % значительно меньше в сравнении с другими продуктами (выход более 80 %). Этот факт можно объяснить снижением реакционной способности изомасляного ангидрида вследствие его пространственного строения.

Классическим способом получения *N*-ацил- β -кетоамидов **V–IX** является взаимодействие *N*-ацилфенилацетамидов **I–IV** и ангидридов карбоновых кислот с использованием в качестве катализатора диацетат трифторида бора (рисунок 2). Реакция основана на *S*-ацилировании по α -кислотному центру соответствующих *N*-ацилфенилацетамидов [19].

Таблица 1. Молекулярные дескрипторы *N*-ацилфенилацетамидов и *N*-ацил- β -кетоамидов, характеризующие лекарствовоподобие

Table 1. Molecular descriptors of *N*-acylphenylacetamides and *N*-acyl- β -ketoamides characterizing druglikeness

Вещество Compound	MW	MLOGP/ WLOGP/XLOGP	NHD	NHA	TPSA	NA	NRB	MR	NG	NR	NCA
I	177	1.7/0.8/0.8	1	2	46.1	24	4	49.0	3	1	10
II	191	2.0/1.2/1.3	1	2	46.1	27	5	53.8	3	1	11
III	205	2.3/1.6/1.7	1	2	46.1	30	6	58.6	3	1	12
IV	205	2.3/1.5/1.9	1	2	46.1	30	5	58.6	3	1	12
V	219	1.3/1.0/0.8	1	3	63.2	29	5	58.8	4	1	12
VI	233	1.6/1.4/1.3	1	3	63.2	32	6	63.6	4	1	13
VII	233	1.6/1.4/1.3	1	3	63.2	32	6	63.6	4	1	13
VIII	247	1.9/1.8/1.7	1	3	63.2	35	7	68.4	4	1	14
IX	247	1.9/1.8/1.7	1	3	63.2	35	7	68.4	4	1	14
Атенолол Atenolol	266	0.7/0.4/0.2	3	4	84.5	41	8	73.6	5	1	14

Рисунок 1. Синтез *N*-ацилфенилацетамидовFigure 1. Synthesis of *N*-acylphenylacetamidesРисунок 2. Синтез *N*-ацил-β-кетоамидовFigure 2. Synthesis of *N*-acyl-β-ketoamides

В данной реакции в качестве ацилирующего реагента *N*-(2-фенилацетил)бутанамида (III) используется достаточно активный уксусный ангидрид, однако выход соединения IX (31 %) значительно снижен в сравнении с выходами других *N*-ацил-β-кетоамидов (55–69 %). Вероятно, это связано со стерическими затруднениями, вызванными объемным и достаточно конформационно подвижным пропиловым фрагментом исходного *N*-(2-фенилацетил)бутанамида.

Как известно, присутствие в молекулах хирального центра приводит к появлению диастереотопных групп, то есть протоны метиленовой группы в ЯМР-спектрах оказываются магнитно-неэквивалентными [20–23].

В ходе подтверждения строения *N*-ацил-β-кетоамидов у соединений VI и VIII было установлено влияние окружения асимметрического атома углерода на протоны прохирального центра метиленовой группы карбонильного фрагмента. Эти протоны оказываются магнитно-неэквивалентными и обнаруживаются в спектре соединений VI в области 2,28–2,48 и 2,57–2,70 м.д. и VIII в области 2,25–2,33 и 2,53–2,61 м.д. в виде двух мультиплетов. Сигнал протона, связанного с асимметрическим углеродным атомом, наблюдается в виде однопотонного синглета при 5,48 (VI) и 5,43 м.д. (VIII).

Фармакологическая часть

Сенсомоторный дефицит у НК группы животных в 3,6 раза ($p < 0,05$) превосходил аналогичный у ЛО животных (рисунок 3). На фоне введения пирacetama в

сравнении с НК группой крыс было отмечено уменьшение выраженности сенсомоторных нарушений у животных на 31,0 % ($p < 0,05$). При применении исследуемых соединений также наблюдалось снижение (относительно НК группы животных) сенсомоторного дефицита у крыс: IX – на 25,1 % ($p < 0,05$), VIII – на 20,3 % ($p < 0,05$), VI – на 33,8 % ($p < 0,05$), III – 27,6 % ($p < 0,05$) и I – на 37,2 % ($p < 0,05$) соответственно. В тоже время введение животным соединений VII, V, II и IV значимого влияния на изменение сенсомоторных реакций у ишемизированных крыс не оказало.

Соединения I и VI превосходят препарат сравнения по степени воздействия на процессы восстановления структурно-функциональной целостности ишемизированных нейронов соматосенсорной коры.

Из теста «УРПИ» следует, что применение соединений VI и IX показало такой же результат латентного времени захода, что и пирacetam (рисунок 4).

При анализе поведения ишемизированных животных в тесте «ТЭИ» [11] (рисунок 5) было установлено, что большинство соединений превосходят препарат сравнения по способности снижения латентного времени «избегания», а применение веществ I, II и VI оказало наиболее выраженный эффект (см. рисунок 5).

В тесте «водный лабиринт Морриса» [12] (рисунок 6) соединения, применение которых привело к наиболее выраженному уменьшению времени поиска площадки по сравнению с референтным препаратом, оказались VII и IX (см. рисунок 6).

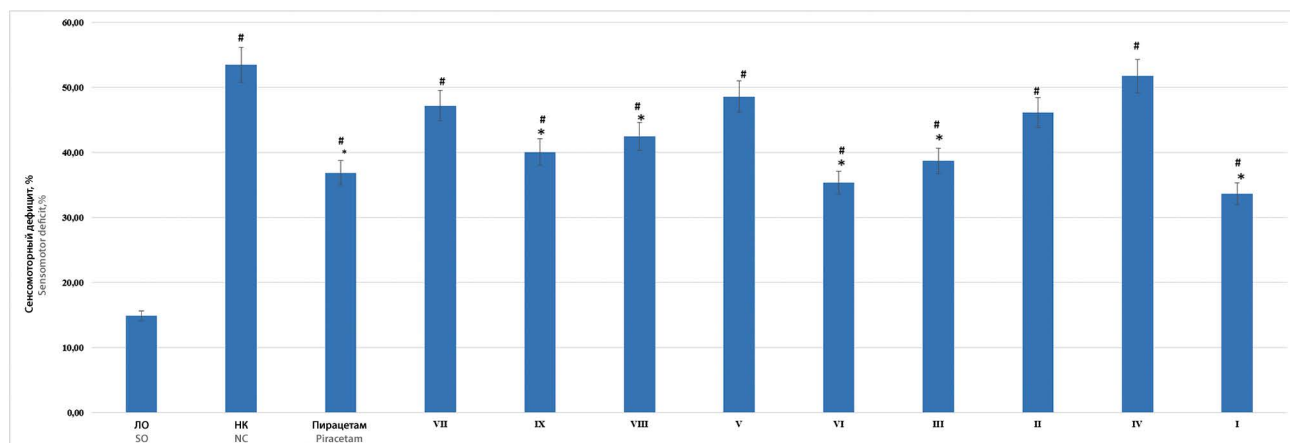


Рисунок 3. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на изменение сенсомоторного дефицита у животных в условиях фокальной ишемии головного мозга.

Обозначение: ЛО – группа ложнооперированных животных; НК – группа крыс негативного контроля; Пирацетам – группа животных, получавшая пирацетам; VII – группа животных, получавшая VII; IX – группа животных, получавшая IX; VIII – группа животных, получавшая VIII; V – группа животных, получавшая V; VI – группа животных, получавшая VI; III – группа животных, получавшая III; II – группа животных, получавшая II; IV – группа животных, получавшая IV; I – группа животных, получавшая I; # – статистически значимо относительно ЛО животных [критерий Ньюмена – Кеулса, ($p < 0,05$)]

Figure 3. Influence of the studied compounds and drugs on the change in sensorimotor deficit in animals under conditions of focal cerebral ischemia.

Note: SO – group of sham-operated animals; NC – group of negative control rats; Piracetam – group of animals receiving piracetam; VII – group of animals receiving VII; IX – group of animals receiving IX; VIII – group of animals receiving VIII; V – group of animals receiving V; VI – group of animals receiving VI; III – group of animals receiving III; II – group of animals receiving II; IV – group of animals receiving IV; I – group of animals receiving I; # – statistically significant relative to LO animals [Newman – Keuls test, ($p < 0.05$)]

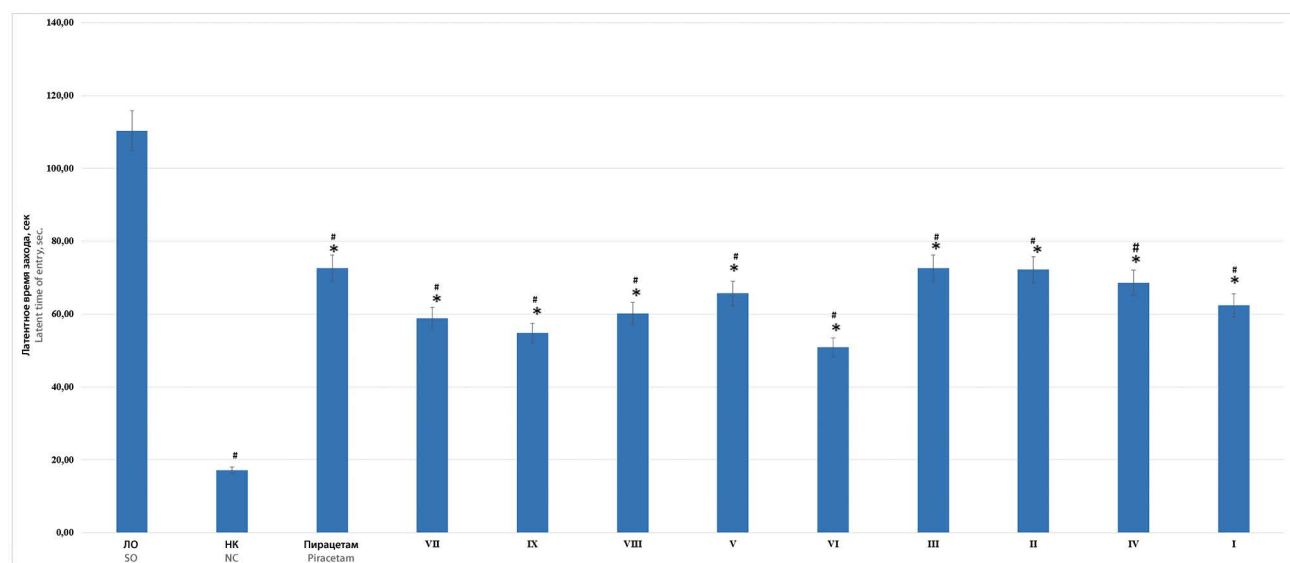


Рисунок 4. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на изменение поведенческих реакций у крыс в тесте «УРПИ».

Обозначение: ЛО – группа ложнооперированных животных; НК – группа крыс негативного контроля; Пирацетам – группа животных, получавшая пирацетам; VII – группа животных, получавшая VII; IX – группа животных, получавшая IX; VIII – группа животных, получавшая VIII; V – группа животных, получавшая V; VI – группа животных, получавшая VI; III – группа животных, получавшая III; II – группа животных, получавшая II; IV – группа животных, получавшая IV; I – группа животных, получавшая I; # – статистически значимо относительно ЛО животных [критерий Ньюмена – Кеулса, ($p < 0,05$)]

Figure 4. Influence of the studied compounds and reference drugs on the change in behavioral reactions in rats in the "Passive avoidance reaction" test.

Note: SO – group of sham-operated animals; NC – group of negative control rats; Piracetam – group of animals receiving piracetam; VII – group of animals receiving VII; IX – group of animals receiving IX; VIII – group of animals receiving VIII; V – group of animals receiving V; VI – group of animals receiving VI; III – group of animals receiving III; II – group of animals receiving II; IV – group of animals receiving IV; I – group of animals receiving I; # – statistically significant relative to LO animals [Newman – Keuls test, ($p < 0.05$)]

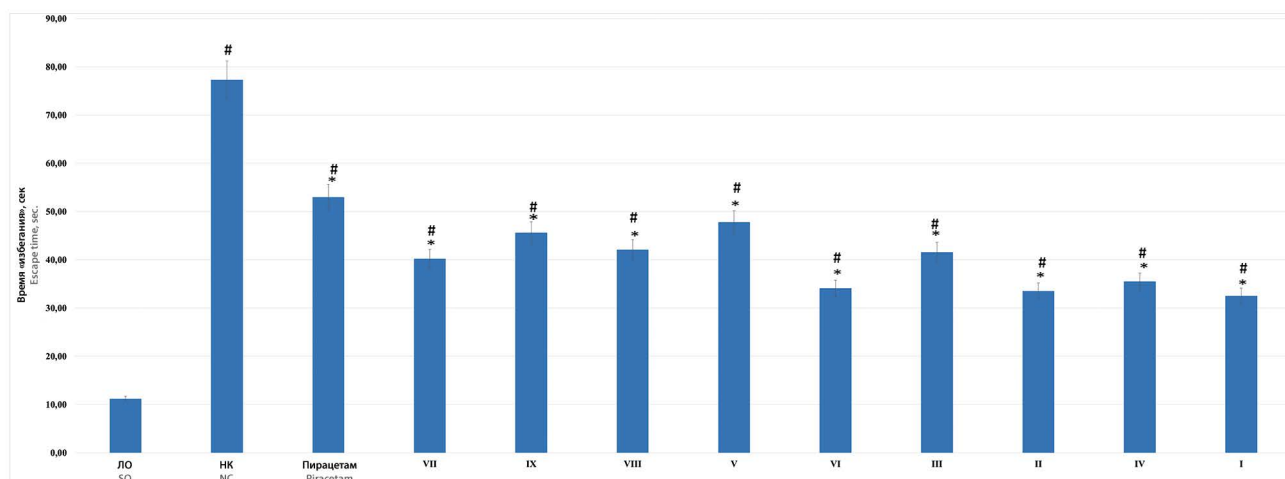


Рисунок 5. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на изменение поведенческих реакций у крыс в тесте «ТЭИ».

Обозначение: ЛО – группа ложнооперированных животных; НК – группа крыс негативного контроля; Пирацетам – группа животных, получавшая пирацетам; VII – группа животных, получавшая VII; IX – группа животных, получавшая IX; VIII – группа животных, получавшая VIII; V – группа животных, получавшая V; VI – группа животных, получавшая VI; III – группа животных, получавшая III; II – группа животных, получавшая II; IV – группа животных, получавшая IV; I – группа животных, получавшая I; # – статистически значимо относительно ЛО животных [критерий Ньюмена – Кейлса, ($p < 0,05$)]

Figure 5. Influence of the investigated compounds and reference drugs on the change in behavioral reactions in rats in the "Extrapolation escape" test.

Note: SO – group of sham-operated animals; NC – group of negative control rats; Piracetam – group of animals receiving piracetam; VII – group of animals receiving VII; IX – group of animals receiving IX; VIII – group of animals receiving VIII; V – group of animals receiving V; VI – group of animals receiving VI; III – group of animals receiving III; II – group of animals receiving II; IV – group of animals receiving IV; I – group of animals receiving I; # – statistically significant relative to LO animals [Newman – Keuls test, ($p < 0.05$)]

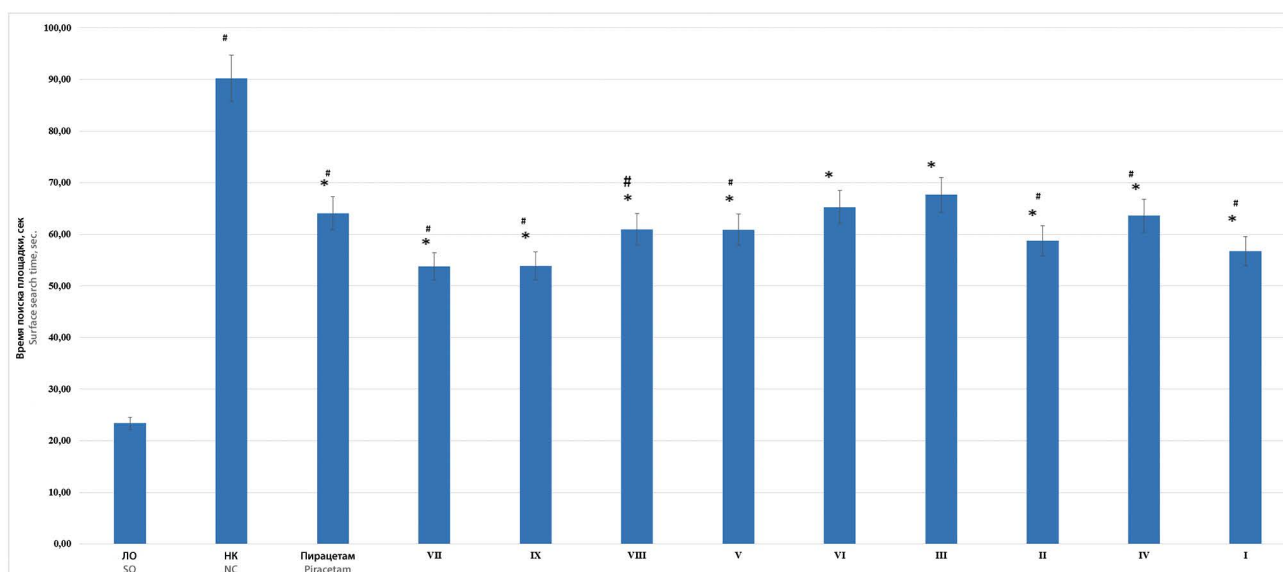


Рисунок 6. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на изменение поведенческих реакций у крыс в тесте «водный лабиринт Морриса».

Обозначение: ЛО – группа ложнооперированных животных; НК – группа крыс негативного контроля; Пирацетам – группа животных, получавшая пирацетам; VII – группа животных, получавшая VII; IX – группа животных, получавшая IX; VIII – группа животных, получавшая VIII; V – группа животных, получавшая V; VI – группа животных, получавшая VI; III – группа животных, получавшая III; II – группа животных, получавшая II; IV – группа животных, получавшая IV; I – группа животных, получавшая I; # – статистически значимо относительно ЛО животных [критерий Ньюмена – Кейлса, ($p < 0,05$)]

Figure 6. Influence of the studied compounds and reference drugs on the change in behavioral reactions in rats in the "Morris water maze" test.

Note: SO – group of sham-operated animals; NC – group of negative control rats; Piracetam – group of animals receiving piracetam; VII – group of animals receiving VII; IX – group of animals receiving IX; VIII – group of animals receiving VIII; V – group of animals receiving V; VI – group of animals receiving VI; III – group of animals receiving III; II – group of animals receiving II; IV – group of animals receiving IV; I – group of animals receiving I; # – statistically significant relative to LO animals [Newman – Keuls test, ($p < 0.05$)]

На основании полученных данных можно предположить, что исследуемые соединения в условиях фокальной ишемии головного мозга способствуют восстановлению когнитивных способностей у животных. Это следует из результатов проведённых фармакологических скрининговых исследований, что предполагает наличие ноотропного потенциала у изучаемых веществ.

Исходя из результатов первичного фармакологического скрининга, выявлены качественные взаимосвязи структура-активность. Наиболее выраженное влияние на изменение сенсомоторных реакций у ишемизированных животных оказывают *N*-ацетил-2-фенилацетамид (**I**) и *N*-ацил-β-кетоамид, содержащий этильный заместитель R₂ (**VI**) (см. рисунок 3).

В тесте «УРПИ» наибольшую активность проявляют *N*-ацил-β-кетоамиды, содержащие метильный заместитель R₁ и этильный заместитель R₂ (**VI**), а также пропил R₁ и метил R₂ (**IX**) (см. рисунок 4).

В тесте экстраполяционного избавления выраженную активность оказывают *N*-ацетил-2-фенилацетамид (**I**), *N*-(2-фенилацетил)пропанамид (**II**) и *N*-ацил-β-кетоамид, который имеет этильный заместитель R₂ (**VI**) (см. рисунок 5).

В тесте «водный лабиринт Морриса» наиболее выраженное влияние проявляют *N*-ацил-β-кетоамиды, содержащие этильный (**VII**) и пропильный (**IX**) заместитель R₁ (см. рисунок 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптимизированный метод синтеза позволил получить ациклические предшественники пиримидин-4(1*H*)-онов с более высокими выходами в сравнении с классическим методом. Осуществлен прогноз и изучена их ноотропная активность. В ходе фармакологического скрининга исследуемые вещества проявили выраженную ноотропную активность. Соединениями-лидерами являются **I**, **II**, **VI** и **IX**, превосходящие пирацетам по степени восстановления когнитивных функций в условиях фокальной ишемии головного мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд. М.: ООО «Издательство Новая Волна»; 2005. 169 с.
2. Вартанян Р.С. Синтез основных лекарственных средств. М.: Медицинское информационное агентство; 2004. 233 с.
3. Орлов В.Д., Липсон В.В., Иванов В.В. Медицинская химия. Харьков: Фолио; 2005. 193 с.
4. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Мирошниченко К.А., Потапова А.А., Кодоники И.П., Аненко Д.С. Производные пиримидина – перспективные корректоры метаболических и функциональных нарушений головного мозга в условиях хронической травматической энцефалопатии. *Вестник смоленской государственной медицинской академии*. 2019;18(3):18–24.
5. Кодоники И.П., Аненко Д.С., Терехов А.Ю., Сидорская С.Ю., Григорянц Э.Г. Синтез 2,6-диалкильных производных пиримидин-4(1*H*)-она, обладающих противовоспалительным действием. *Фармация*. 2021;70(1):11–17. DOI: 10.29296/25419218-2021-01-02.
6. Kim K., Kim D., Lee H., Lee T.H., Kim K.-Y., Kim H. New Pyrimidinone-Fused 1,4-Naphthoquinone Derivatives Inhibit the Growth of Drug Resistant Oral Bacteria. *Biomedicines*. 2020;8(6):160. DOI: 10.3390/biomedicines8060160.
7. Kelada M., Walsh J. M. D., Devine R. W., McArdle P., Stephens J. C. Synthesis of pyrazolopyrimidinones using a "one-pot" approach under microwave irradiation. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2018;14:1222–1228. DOI: 10.3762/bjoc.14.104.
8. MacDonald J. A., Sutherland C., Carlson D. A., Bhaidani S., Al-Ghabkari A., Sward K., Haystead T. A. J., Walsh M. P. A Small Molecule Pyrazolo[3,4-*d*]Pyrimidinone Inhibitor of Zipper-Interacting Protein Kinase Suppresses Calcium Sensitization of Vascular Smooth Muscle. *Molecular Pharmacology*. 2016;89(1):105–117. DOI: 10.1124/mol.115.100529.
9. Elsharif A. M. Synthesis of New Pyrimidinone Derivatives and Their Respective Biological Structure Assessment. *Orient Journal of Chemistry*. 2019;35(2):658–667. DOI: 10.13005/ojc/350221.
10. Bederson J. B., Pitts L. H., Tsuji M., Nishimura M. C., Davis R. L., Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17:472–476.
11. Cohen P. A., Zakharevich I., Gerona R. Presence of Piracetam in Cognitive Enhancement Dietary Supplements. *JAMA Internal Medicine*. 2019;180(3):458–459. DOI: 10.1001/jamainternmed.2019.5507.
12. Keil U., Scherping I., Hauptmann S., Schuessel K., Eckert A., Müller W. E. Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress. *British Journal of Pharmacology*. 2005;147(2):199–208. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706459.
13. Миронов А.Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
14. Fleming S. M., Ekhatov O. R., Ghisays V. Assessment of Sensorimotor Function in Mouse Models of Parkinson's Disease. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;76:50303. DOI: 10.3791/50303.
15. Плотникова Е.Ю., Грачева Т.Ю., Синьков М.А., Сухих А.С. Анализ ошибок при проведении сравнительных исследований клинической и экономической эффективности на примере дженериков урсодезоксихолевой кислоты. *ПМЖ*. 2019;27(5):3–7.
16. Hayashi M., Bachman S., Hashimoto S., Eichman C. C., Stoltz B. M. Ni-Catalysed Enantioselective C-Acylation of α-substituted Lactams. *Journal of the American Chemical Society*. 2016;138(29):8997–9000. DOI: 10.1021/jacs.6b02120.
17. Moradian M., Amini A., Naeimi H. ZnCl₂@MWCNTs nanocomposite as an efficient and reusable catalyst for direct regioselective ortho C-acylation of phenolic compounds under solvent-free and microwave conditions. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2017;10(4):228–234. DOI: 10.1080/17518253.2017.1349194.
18. Lee J., Hong M., Jung Y., Cho E., Rhee H. Synthesis of 1,3,5-trisubstituted-1,2,4-triazoles by microwave-assisted N-acylation of amide derivatives and the consecutive reaction with hydrazine hydrochlorides. *Tetrahedron*. 2012;68(8):2045–2051.
19. Li W., Zheng Y., Qu E., Bai J. β-Keto Amides: A Jack-of-All-Trades Building Block in Organic Chemistry. *European Journal of Organic Chemistry*. 2021;37:5151–5192. DOI: 10.1002/ejoc.202100692.
20. Оспанов М.А., Турмуханова М.Ж., Мурзагулова К.Б., Абилов Ж.А. Стереохимические особенности непредельных амидоэфиров – полупродуктов в синтезе рихлоаина. *Вестник КазНУ. Серия химическая*. 2014;3(75):361–368. DOI: 10.15328/chemb_2014_361-68.
21. Терней А.Л. Современная органическая химия. Пер. с англ. В 2 томах. 2 том. М.: Мир; 1981. С. 559–561.
22. Пакальнис В.В., Зерова И.В., Якимович С.И. Взаимодействие ароил- и гетероароилтрифторацетонов с ацилгидразинами: региональность и таутомерия продуктов конденсации. *ЖОХ*. 2007;77:1665–1676.
23. Мещерякова С.А. Синтез, свойства, структура и биологическая активность новых S и N-производных пиримидина. Дис. ... докт. фарм. наук. Уфа; 2015. 205 с. Доступно по: <https://www.disscat.com/content/sintez-svoistva-struktura-i-biologicheskaya-aktivnost-novykh-s-i-n-proizvodnykh-pirimidina>. Ссылка активна на 29.12.2021.

REFERENCES

- Mashkovskij M. D. *Lekarstvennye sredstva* [Medicinal products]. 15th ed. Moscow: LLC "Izdatel'stvo Novaja Volna"; 2005. 169 p. (In Russ.)
- Vartanjan R. S. *Sintez osnovnykh lekarstvennykh sredstv* [Synthesis of basic medicines]. Moscow: Medicinskoe informacionnoe agentstvo; 2004. 233 p. (In Russ.)
- Orlov V. D., Lipson V. V., Ivanov V. V. *Medicinskaja himija* [Medicinal chemistry]. Kharkov: Folio; 2005. 193 p. (In Russ.)
- Voronkov A. V., Pozdnyakov D. I., Miroshnichenko K. A., Potapova A. A., Kodonidi I. P., Anenko D. S. Pyrimidine derivatives are promising correctors of metabolic and functional disorders of the brain in conditions of chronic traumatic encephalopathy. *Vestnik Smolenskoj Gosudarstvennoj Medicinskoj Akademii*. 2019;18(3):18–24. (In Russ.)
- Kodonidi I. P., Anenko D. S., Terehov A. J., Sidorskaja S. J., Grigorjanc J. G. Synthesis of 2,6-dialkyl derivatives of pyrimidine-4 (1h)-one with an anti-inflammatory effect. *Farmatsiya*. 2021;70(1):11–17. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2021-01-02.
- Kim K., Kim D., Lee H., Lee T. H., Kim K.-Y., Kim H. New Pyrimidinone-Fused 1,4-Naphthoquinone Derivatives Inhibit the Growth of Drug Resistant Oral Bacteria. *Biomedicines*. 2020;8(6):160. DOI: 10.3390/biomedicines806160.
- Kelada M., Walsh J. M. D., Devine R. W., McArdle P., Stephens J. C. Synthesis of pyrazolopyrimidinones using a "one-pot" approach under microwave irradiation. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2018;14:1222–1228. DOI: 10.3762/bjoc.14.104.
- MacDonald J. A., Sutherland C., Carlson D. A., Bhaidani S., Al-Ghabkari A., Sward K., Haystead T. A. J., Walsh M. P. A Small Molecule Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidinone Inhibitor of Zipper-Interacting Protein Kinase Suppresses Calcium Sensitization of Vascular Smooth Muscle. *Molecular Pharmacology*. 2016;89(1):105–117. DOI: 10.1124/mol.115.100529.
- Elsharif A. M. Synthesis of New Pyrimidinone Derivatives and Their Respective Biological Structure Assessment. *Orient Journal of Chemistry*. 2019;35(2):658–667. DOI: 10.13005/ojc/350221.
- Bederson J. B., Pitts L. H., Tsuji M., Nishimura M. C., Davis R. L., Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17:472–476.
- Cohen P. A., Zakharevich I., Gerona R. Presence of Piracetam in Cognitive Enhancement Dietary Supplements. *JAMA Internal Medicine*. 2019;180(3):458–459. DOI: 10.1001/jamainternmed.2019.5507.
- Keil U., Scherping I., Hauptmann S., Schuessel K., Eckert A., Müller W. E. Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress. *British Journal of Pharmacology*. 2005;147(2):199–208. DOI:10.1038/sj.bjp.0706459.
- Mironov A. N., editor. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv* [Guidelines for conducting pre-clinical studies of drugs]. Part One. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (In Russ.)
- Fleming S. M., Ekhatov O. R., Ghisays V. Assessment of Sensorimotor Function in Mouse Models of Parkinson's Disease. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;76:50303. DOI: 10.3791/50303.
- Plotnikova E. Y., Gracheva T. Y., Sinkov M. A., Sukhikh A. S. Error analysis in comparative studies of clinical and economic efficiency using the ursodeoxycholic acid generics example. *RMJ*. 2019;27(5):3–7. (In Russ.)
- Hayashi M., Bachman S., Hashimoto S., Eichman C. C., Stoltz B. M. Ni-Catalysed Enantioselective C-Acylation of α -substituted Lactams. *Journal of the American Chemical Society*. 2016;138(29):8997–9000. DOI: 10.1021/jacs.6b02120.
- Moradian M., Amini A., Naeimi H. ZnCl₂@MWCNTs nanocomposite as an efficient and reusable catalyst for direct regioselective ortho C-acylation of phenolic compounds under solvent-free and microwave conditions. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2017;10(4):228–234. DOI: 10.1080/17518253.2017.1349194.
- Lee J., Hong M., Jung Y., Cho E., Rhee H. Synthesis of 1,3,5-trisubstituted-1,2,4-triazoles by microwave-assisted N-acylation of amide derivatives and the consecutive reaction with hydrazine hydrochlorides. *Tetrahedron*. 2012;68(8):2045–2051.
- Li W., Zheng Y., Qu E., Bai J. β -Keto Amides: A Jack-of-All-Trades Building Block in Organic Chemistry. *European Journal of Organic Chemistry*. 2021;37:5151–5192. DOI: 10.1002/ejoc.202100692.
- Ospanov M. A., Turmuhanova M. Z., Murzagulova K. B., Abilov Z. A. Stereochemical features of unsaturated aminodiester – intermediates in the synthesis of Richlocaine. *Vestnik KazNU. Seriya khimicheskaya = Chemical Bulletin of Kazakh National University. Seriya himicheskaya*. 2014;3(75):361–368. (In Russ.) DOI: 10.15328/chemb_2014_361-68.
- Terney A. L. *Sovremennaya organicheskaya khimiya* [Modern organic chemistry]. In 2 volumes. 2 volume. Moscow: Mir; 1981. 559–561 p. (In Russ.)
- Pakal'nis V. V., Zerova I. V., Jakimovich S. I. Interaction of aroyl- and heteroaroyltrifluoroacetones with acylhydrazines: regional orientation and tautomerism of condensation products. *Zhurnal organicheskoy himii*. 2007;77:1665–1676. (In Russ.)
- Meshcheryakova S. A. *Sintez, svoystva, struktura i biologicheskaya aktivnost' novykh S i N-proizvodnykh pirimidina* [Synthesis, properties, structure and biological activity of new S and N-pyrimidine derivatives] [dissertation]. Ufa; 2015. 205 p. Available at: <https://www.dissercat.com/content/sintez-svoystva-struktura-i-biologicheskaya-aktivnost-novykh-s-i-n-proizvodnykh-pirimidina>. Accessed: 29.12.2021. (In Russ.)

ЕВРАЗИЙСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ 2022

Встреча ведущих представителей фармацевтической отрасли и производителей товаров медицинского назначения из стран ЕАЭС

1–3 марта, 2022 | Марриотт Гранд Отель, Москва

КЛЮЧЕВЫЕ ТЕМЫ ФОРУМА 2022:

- ✓ Особенности развития общего фармацевтического рынка стран ЕАЭС
- ✓ Пандемия COVID-19 и ее воздействие на рынок и фармацевтическую индустрию
- ✓ Регистрация лекарственных препаратов по общим правилам ЕАЭС
- ✓ Маркировка лекарственных препаратов в рамках ЕАЭС
- ✓ GMP инспектирование в странах ЕАЭС
- ✓ Референтное ценообразование и ценовое регулирование на лекарственные препараты в ЕАЭС



**РАСШИРЕННАЯ ФОКУС-СЕССИЯ
ПО УЗБЕКИСТАНУ**



**ФОКУС СЕССИИ ПО ОТДЕЛЬНЫМ
СТРАНАМ ЕАЭС И СНГ**

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-51-58>
УДК 578.286; 612.017.11; 616-006.484.04



Обзорная статья / Review article

Вирус кори как векторная платформа для иммунотерапии опухолей головного мозга (обзор)

Е. Ю. Николаева¹, Ю. Р. Щетинина¹, И. Е. Шохин¹, В. В. Зверев^{1,2}, О. А. Свитич^{1,2},
О. Ю. Сусова³, А. А. Митрофанов³, Ю. И. Аммур^{1*}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова), 105064, Россия, г. Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а

² Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А. А. Воробьева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, 125009, Россия, Москва, ул. Моховая, д. 11, стр. 10

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина) 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

*Контактное лицо: Аммур Юлия Игоревна. E-mail: yulia.ammour@yahoo.fr

ORCID: Е. Ю. Николаева – <https://orcid.org/0000-0003-2898-9722>; Ю. Р. Щетинина – <https://orcid.org/0000-0002-6382-9612>;

И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; В. В. Зверев – <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>; О. А. Свитич – <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>;

О. Ю. Сусова – <https://orcid.org/0000-0001-8192-7913>; А. А. Митрофанов – <https://orcid.org/0000-0002-4125-7342>; Ю. И. Аммур – <https://orcid.org/0000-0003-0223-5738>.

Статья поступила: 29.10.2021

Статья принята в печать: 07.02.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Одним из подходов в иммунотерапии солидных опухолей головного мозга является применение онколитических вирусов. Вакцинные штаммы вируса кори рассматривают в качестве перспективных кандидатов для терапии мезотелиомы, нейробластомы и мультиформной глиобластомы. Гиперэкспрессия рецептора CD46 и других белков на поверхности злокачественных клеток позволяет вирусу кори таргетно инфицировать и лизировать опухоль, индуцируя иммунный ответ. Однако широкая иммунизация населения и устойчивость новообразований к онколизу представляют трудности в клинической практике.

Текст. В настоящем обзоре обсуждаются подходы к модификации генома вируса кори с целью повысить таргетность виротерапии, преодолеть существующий иммунитет и усилить онколитический эффект. Показано, что экспрессия провоспалительных цитокинов на вирусных частицах приводит к регрессии опухоли у мышей и запускает Т-клеточный ответ. Для преодоления вирус-нейтрализующих антител применяются подходы по экранированию вирусных частиц, использованию клеток-носителей и изменению эпитопа белка, обеспечивающего проникновение вируса в клетку. Кроме того, вставка репортерных генов позволяет отслеживать инфицирование таргетных клеток *in vivo*. Комбинация с новейшими методами иммунотерапии, такими как ингибиторы иммунных контрольных точек, демонстрирует синергизм эффектов, что позволяет рассчитывать на успешное применение сочетанных подходов в терапии рефрактерных опухолей.

Заключение. Атенуированные штаммы вируса кори представляют собой удобную и безопасную платформу для иммунотерапии опухолей головного мозга.

Ключевые слова: онколитические вирусы, вирус кори, иммунотерапия, рецептор CD46, виротерапия

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Ю. И. Аммур разрабатывала дизайн статьи. Ю. Р. Щетинина, О. Ю. Сусова, А. А. Митрофанов участвовали в проведении научного поиска. Е. Ю. Николаева ответственна за написание текста. И. Е. Шохин, О. А. Свитич, В. В. Зверев проводили рецензирование и одобрение на подачу в журнал.

Для цитирования: Николаева Е. Ю., Щетинина Ю. Р., Шохин И. Е., Зверев В. В., Свитич О. А., Сусова О. Ю., Митрофанов А. А., Аммур Ю. И. Вирус кори как векторная платформа для иммунотерапии опухолей головного мозга. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):51–58. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-51-58>

Measles Virus as a Vector Platform for Glioblastoma Immunotherapy (Review)

Eugenia Yu. Nikolaeva¹, Yulia R. Shchetinina¹, Igor E. Shokhin¹, Vitaly V. Zverev^{1,2},
Oxana A. Svitich^{1,2}, Olga Yu. Susova³, Alexey A. Mitrofanov³, Yulia I. Ammour^{1*}

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera", 5a, Malyy Kazennyj lane, Moscow, 105064, Russia

² Department of Microbiology, Virology and Immunology named after Academician A. A. Vorobiov I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation, 11/10, Mokhovaya str., Moscow, 125009, Russia

³ FSBI "National Medical Research Center of Oncology. N. N. Blokhin", 23, Kashirskoe highway, Moscow, 115478, Russia

*Corresponding author: Yulia I. Ammour. E-mail: yulia.ammour@yahoo.fr

ORCID: Eugenia Yu. Nikolaeva – <https://orcid.org/0000-0003-2898-9722>; Yulia R. Shchetinina – <https://orcid.org/0000-0002-6382-9612>;

Igor E. Shokhin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; Vitaly V. Zverev – <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>; Oxana A. Svitich – <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>;

Olga Yu. Susova – <https://orcid.org/0000-0001-8192-7913>; Alexey A. Mitrofanov – <https://orcid.org/0000-0002-4125-7342>; Yulia I. Ammour – <https://orcid.org/0000-0003-0223-5738>.

Received: 29.10.2021

Revised: 07.02.2022

Published: 25.02.2022

© Николаева Е. Ю., Щетинина Ю. Р., Шохин И. Е., Зверев В. В., Свитич О. А., Сусова О. Ю., Митрофанов А. А., Аммур Ю. И., 2022

© Nikolaeva E. Yu., Shchetinina Yu. R., Shokhin I. E., Zverev V. V., Svitich O. A., Susova O. Yu., Mitrofanov A. A., Ammour Yu. I., 2022

Abstract

Introduction. Oncolytic virotherapy is one of the approaches in immunotherapy of solid brain tumors. Measles virus vaccine strains are prospective agents for the therapy of cancers such as neuroblastoma, mesothelioma, and glioblastoma multiforme. The hyperexpression of the CD46 and other receptors on the surface of malignant cells allows the measles virus to infect and lyse the tumor, thus inducing an immune response. However, widespread immunization of the population and the resistance of neoplasms to oncolysis present difficulties in clinical practice.

Text. This review covers approaches to modifying the measles virus genome in order to increase specificity of virotherapy, overcome existing immunity, and enhance the oncolytic effect. It was shown that expression of proinflammatory cytokines on viral particles leads to tumor regression in mice and triggers a T-cell response. Several approaches have been used to overcome virus-neutralizing antibodies: shielding viral particles, using host cells, and altering the epitope of the protein that enables entry of the virus into the cell. Furthermore, the insertion of reporter genes allows the infection of target cells to be monitored in vivo. A combination with the latest immunotherapies, such as immune checkpoint inhibitors, demonstrates synergistic effects, which suggests the successful use of combined approaches in the therapy of refractory tumors.

Conclusion. Measles virus attenuated strains appear to be an easy-to-modify and reliable platform for the therapy of solid brain tumors.

Keywords: oncolytic viruses, measles virus, immunotherapy, CD46 receptor, virotherapy

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Yulia I. Ammour designed the review. Yulia R. Shchetinina, Olga Yu. Susova, Alexey A. Mitrofanov provided the scientific literature search. Eugenia Yu. Nikolaeva is responsible for the text writing. Igor E. Shokhin, Oxana A. Svitich, Vitaly V. Zverev reviewed and approved the submission to the journal.

For citation: Nikolaeva E. Yu., Shchetinina Yu. R., Shokhin I. E., Zverev V. V., Svitich O. A., Susova O. Yu., Mitrofanov A. A., Ammour Yu. I. Measles virus as a vector platform for glioblastoma immunotherapy. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):51–58. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-51-58>

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в онкологическую практику активно внедряются подходы, направленные на усиление противоопухолевого иммунного ответа. Применение онколитических вирусов, нацеленных на различные опухоли – одно из перспективных направлений иммунотерапии [1]. Механизм онколитического действия основан не только на прямом лизисе опухолевых клеток, но и на активации противоопухолевого ответа за счет высвобождения сигналов опасности (PAMPs, DAMPs) и опухолеспецифических белков, что позволяет преодолеть иммуносупрессивное микроокружение опухоли [2].

Мультиформная глиобластома (ГБМ), или глиобластома, – наиболее распространенная и наиболее агрессивная опухоль центральной нервной системы у взрослых. Общая выживаемость при ГБМ составляет 15 месяцев, а 5-летняя выживаемость 5–7 % после первоначального диагноза [3]. Существуют многочисленные проблемы, связанные с лечением глиобластомы, включая неэффективную доставку лекарств или агентов через гематоэнцефалический барьер, обширную внутриопухолевую и межопухолевую гетерогенность, избыточные сигнальные пути и иммуносупрессивное микроокружение. Онколитические вирусы представляют собой перспективный терапевтический подход поскольку помимо литической активности они могут преодолевать иммуносупрессию, стимулируя врожденный иммунитет. На момент 2021 года в мире проводится 20 клинических

испытаний с применением онколитических вирусов для терапии ГБМ; 4 клинических испытания для нейробластомы [4].

Вирус кори: преимущества и ограничения

Аттенуированные штаммы вируса кори (measles virus, MV) рассматривают в качестве перспективных кандидатов для онколитической терапии. Длительная история применения вакцин, содержащих аттенуированные штаммы вирусов кори, свидетельствует об их безопасности для организма человека в виду их генетической стабильности. Несмотря на широкий охват вакцинации, MV в качестве онколитического агента показали достаточную эффективность и безопасность в доклинических и клинических испытаниях против многих типов рака, включая мезотелиому, глиому и ГБМ [5, 6]. При этом, вакцинные штаммы MV удобны для клонирования, что позволяет модифицировать вирус, повышая его онколитическую эффективность.

MV представляет собой одноцепочечный (–)РНК вирус, принадлежащий к семейству Paramyxoviridae. Проникновение MV в клетку опосредуется прикреплением вирусного белка гемагглютинина (H) как минимум к одному из трех известных рецепторов клеточной поверхности: мембранному кофакторному белку, члену семейства регуляторных белков компонента (CD46), сигнальной молекуле, активирующей лимфоциты (SLAM) или нектину-4 [7]. Штаммы MV дикого типа в основном связываются с рецептором

SLAM, аттенуированные вакцинные штаммы MV Edmonston B (MV-Edm) и Ленинград-16 (L-16) [8] проникают через рецептор CD46, в то время как нектин-4 может использоваться как штаммами дикого типа, так и штаммами MV-Edm [7].

Неопластические клетки гиперэкспрессируют рецепторы CD46 на клеточной поверхности, опосредуя опухоль-специфический литический эффект аттенуированных штаммов вируса [9]. Однако хотя молекулы CD46 обильно экспрессируются на поверхности опухолевых клеток, что способствует их эффективному инфицированию, некоторые клетки проявляют устойчивость к онколизу после проникновения вируса, что указывает на то, что другие процессы могут влиять на его онколитическую эффективность [9].

Действительно, недавние исследования выявили экспрессию гена интерферон-индуцированного трансмембранного белка 1 (IFITM1) как ответственного интерферон-опосредованного гена (interferon-stimulated gene, ISG) за ограничение репликации MV в опухолевых клетках человека [10].

Чувствительность MV к противовирусным реакциям также была обнаружена в исследовании Kurokawa et al. [11]. В частности, было показано, что мыши, несущие ксенотрансплантаты ГБМ человека с дефектным путем интерферона, были более чувствительны к лечению MV. Продукция вирионов инфекционного потомства повышалась в 387 раз по сравнению с мышами, несущими ГБМ с интактным путем интерферона. Более того, анализ экспрессии генов в образцах опухолей от пациентов с ГБМ, получавших MV (NCT00390299), показал обратную корреляцию между экспрессией ISG и вирусной репликацией [11]. Таким образом, экспрессия IFITM1 может служить биомаркером устойчивости к MV-виротерапии для пациентов с ГБМ.

Подходы к модификации генома MV

С развитием генетических технологий появилась возможность усилить онколитические свойства MV, вооружив вирус генами, кодирующими белки, усиливающие противоопухолевый эффект, или повысив селективность модифицированного вируса в отношении клеток опухоли.

Первый геном MV, ставший доступным для генетических модификаций, был получен в результате клонирования вакцинного штамма MV-Edm после его пассирования на клетках Vero [12]. Дополнительные единицы транскрипции могут быть довольно легко вставлены в антигеномные последовательности MV. Так, возможно создание разнообразных модификаций MV, различающихся по репликативной способности, цитотоксичности [13], тропизму к рецепторам или воздействию на индукцию клеточного интерферонного ответа и апоптоз клеток-мишеней [14], что в совокупности отражает противоопухолевую активность вирусов.

Вместе с тем геном MV имеет две отличительные особенности, которые значительно усложняют задачу по получению рекомбинантных штаммов на их основе [15]:

1. Как и у всех (-)РНК-вирусов, геном MV представляет собой матрицу, необходимую для образования мРНК, с которой реплицируется антигеномная РНК, выступающая в свою очередь матрицей для синтеза геномной РНК. Этап транскрипции характеризуется образованием коротких транскриптов, которые, как правило, экпированы и полиаденилированы, тогда как на стадиях репликации синтезируются немодифицированные полно-размерные транскрипты.
2. Геномная РНК биологически активна, только когда она присутствует в виде рибонуклеопротеина (РНП), то есть связана с нуклеокапсидным белком и вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой. РНП имеет очень жесткую структуру, что делает вирус полностью устойчивым к расщеплению клеточными РНКазами. Таким образом, геномы и антигеномы должны быть инкапсидированы внутри культивируемых клеток, т. е. пока они синтезируются искусственно с матрицы клонированной кДНК чужеродными ДНК-зависимыми РНК-полимеразами, коэкспрессирующимися в клетках-хозяевах.

Существует несколько подходов к модификации генома MV. При простом подходе транскрипты вводятся в клетки, параллельно инфицированные соответствующим родительским вирусом. Более сложный вариант предполагает трансфекцию вместе с полногеномной последовательностью минирепликационными, кодирующими инкапсидирующие белки – нуклеокапсид (N), фосфопротеин (P) и РНК-полимеразу (L) для образования биологически активных РНП в клетках, инфицированных также вирусом осповакцины (vTF7-3), кодирующим РНК-полимеразу T7 на высоких уровнях. При этом все последовательно-сти должны содержать T7-промоторы. Такая стратегия обеспечивает эффективную транскрипцию всех вирус-специфических клонированных сегментов в трансфицированных клетках.

Однако ввиду крупного размера генома MV, он редко реплицируется на высоких титрах и образует большие полиплоидные вирионы, которые легко инактивируются химическими и физическими факторами. Таким образом, предпочтительнее использовать метод сборки вируса без стадии очистки от вирус-помощников. Это достигается за счет трансфекции плазмидами, кодирующими белки N, P и РНК-полимеразу T7 под контролем CMV-промоторов.

Очевидно, что с плазмиды возможна гораздо более слабая экспрессия РНК-полимеразы T7, чем достижимо с хелперным вирусом. Однако в выбранной стратегии плазмиды, кодирующие вирусные белки N и P, которые требуются в больших количествах, не зависят от промоторов T7. При этом относительно

низкий уровень РНК-полимеразы Т7 считается достаточным для синтеза антигенной РНК и мРНК, кодирующей большую вирусную полимеразу, которая требуется в небольших количествах [15].

Следует отметить, что для увеличения эффективности изначально использовали вспомогательные клетки, стабильно трансфицированные плазмидами, кодирующими РНК-полимеразу Т7, N и Р. Далее их временно трансфицировали плазмидами, кодирующими полноразмерную антигенную последовательность и большую вирусную РНК-полимеразу. Так, с помощью данного подхода был получен MV Ed-tag из одиночного синцития [12].

Дальнейшие модификации сборки MV включают постепенный переход от использования стабильно трансфицированных клеток к временно трансфицированным клеточным линиям. При таком подходе стандартные клеточные линии необходимо трансфицировать одновременно всеми плазмидами, содержащими CMV-промоторы, распознаваемые клеточной РНК-полимеразой II, находящейся в ядрах, а не промоторами Т7 [16].

Ретаргетинг вируса кори

Как уже отмечалось ранее, рецептор CD46 гиперэкспрессирован на поверхности многих опухолевых клеток [17]. Однако молекулы CD46 также присутствуют и в здоровых тканях, что может приводить к инфицированию неопухолевых клеток. Поэтому были предложены подходы к повышению избирательности онколитических MV к опухолевым клеткам.

Для усиления селективности онколитического вируса, необходимо, чтобы жизненный цикл вируса зависел от свойств конкретных опухолевых клеток. Самая привлекательная стратегия перенацеливания вируса заключается в его нацеливании на рецептор, специфичный для конкретного типа опухолевых клеток. Этого можно добиться с помощью введения специфических мутаций в вирусный белок гемагглютинин Н, отвечающий за связывание с рецепторами MV, для его дополнительного связывания с конкретным сайтом узнавания рецептора на поверхности выбранной опухолевой клетки [18]. Помимо естественных рецепторов, таких как CEA, CD20, CD30, CD38, CD133, CD138, IL-13R, uPAR, были опробованы сконструированные белки с анкириновыми повторами (DARPs) в отношении EpCAM, IGFR [19], одноцепочечные фрагменты антител (scFv's) [20] к CEA, EGFR, фолатному рецептору, HER2/neu; Т-клеточные рецепторы (TCR) [21], и цистеиновые узлы [22]. Так, одновременное специфическое нацеливание на две различные структуры поверхности опухолевых клеток повысило эффективность терапии [23]. С другой стороны, проникновение MV в клетку критически зависит от протеолитической активации вирусного белка слияния F [24]. Белок F обычно активируется в транс-сети аппарата Гольджи вирус-продуцирующих клеток посредством

расщепления на две субъединицы F1 и F2 повсеместно распространенными фуриноподобными протеазами [13]. Заменяв многоосновный мотив расщепления в белке F на сайт для опухоли-ассоциированных протеаз, например матриксных металлопротеаз, гиперактивированных в опухолях и способствующих их инвазивному росту за счет разрушения внеклеточного матрикса, репликация MV может быть ограничена опухолевой тканью богатой протеазами. Такое нацеливание вируса на протеазы может быть совмещено с высокоэффективным ретаргетингом на специфичные рецепторы на поверхности опухолевых клеток, что позволяет повысить эффективность виротерапии.

Кроме того, возможен таргетинг после вирусного проникновения путем интеграции сайтов-мишеней miRNA в вирусную РНК [25]. Для усиления онколитического эффекта, возможно, оптимальна комбинация сайтов-мишеней miRNA.

Таким образом, перенацеливание вируса способно увеличить его специфичность по отношению к опухолевым клеткам, что повышает безопасность и эффективность виротерапии.

Усиление онколитического эффекта

Хотя принцип действия онколитических вирусов изначально предполагает прямой лизис опухолевых клеток, в настоящее время принято считать, что основным механизмом действия виротерапии в целом является иммунный ответ, вызванный продолжающимся вирусным инфицированием опухолевой ткани. Таким образом, иммунологически «холодные» опухоли становятся «горячими» и доступными для иммуноопосредованного разрушения. Действительно, основным механизмом действия модифицированного онколитического MV, кодирующего GM-CSF, показана индукция противоопухолевого ответа на иммунокомпетентной модели мышей [26]. Но и без дополнительного усиления эффективности, заражение MV неопластических клеток само по себе вызывает сильный иммунный ответ. MV-инфекция стимулирует активацию многих иммунных клеток, таких как миелоидные и плазматикоидные дендритные клетки, а также макрофагальные клетки [27]. Естественные киллеры (NK), нейтрофилы и цитокин-индуцированные киллеры усиленно инфильтрируют опухоль [28]; также активируется адаптивная иммунная система, что проявляется в усиленной инфильтрации и индукции опухолеспецифических Т-клеток [29]. Такая опосредованная индукция противоопухолевого иммунитета является ненаправленной и поэтому не может гарантировать таргетное нацеливание на критически значимые опухолевые антигены.

С целью запуска таргетного иммунного ответа через критически значимые драйверные гены, кодирующие ключевые факторы, от которых зависит развитие опухолевых клеток, используют стратегии сочетания онколитических вирусов с факторами,

модулирующими опухолевое микроокружение. На данный момент штаммы MV Edmonston B, Schwarz и Moraten были модифицированы и протестированы *in vitro* и *in vivo* в отношении ГБМ, множественной миеломы, а также меланомы, лимфомы, рака поджелудочной железы, легких и др. Для усиления эффективности описаны рекомбинантные MV со следующими встроенными генами:

- ✓ NIS (sodium iodine symporter), позволяющий усилить терапевтический эффект за счет локальной радиотерапии ^{131}I ;
- ✓ PNP (purine nucleoside phosphorylase), конвертирующий флударабин в более токсичную форму 2-флуороаданин;
- ✓ SCD (super cytosine desaminase), конвертирующий 5-FC в 5-FU для локальной химиотерапии;
- ✓ GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulation factor), привлекающий Т-клетки, нейтрофилы и индуцирующий антиопухолевый иммунитет;
- ✓ IL-12, IL-15, активирующие NK и Т-клетки;
- ✓ IFN β , стимулирующий иммунный ответ;
- ✓ $\alpha\text{PD}1$, $\alpha\text{CTLA}4$, блокирующие иммунные контрольные точки;
- ✓ $\mu\text{CLDN}-6$, hTERT, презентующие TAA (tumor associated antigen);
- ✓ NAP [neutrophil activating protein (*H.pylori*)], активирующий нейтрофилы;
- ✓ $\alpha\text{CD}3/\alpha\text{CD}20$, $\alpha\text{CD}3/\alpha\text{CEA}$, активирующие Т-клетки;
- ✓ гены дикого MV, подавляющие врожденный иммунный ответ;
- ✓ BNiP3, реактивирующий апоптоз;
- ✓ эндостатин-ангиостатин, ингибирующий неоангиогенез, и другие [30].

Так, иммуностимулирующий эффект MV, кодирующего hTERT в качестве TAA, был показан в исследованиях на IFNAR-/-CD46Ge-мышях (трансгенно экспрессирующие человеческий CD46 на фоне дефицита рецепторов интерферона I типа), являющихся в настоящее время наиболее предпочтительной доклинической моделью [31].

Доклинические и клинические исследования

Определение того, какие клетки или ткани инфицированы онколитическим вирусом, значительно облегчается за счет использования репортерных генов, которые позволяют неинвазивно обнаружить вирус в живых клетках и организме. Не интерферирующие с жизненным циклом вируса белки-маркеры, такие как флуоресцентные белки, широко используются для отслеживания репликации и распространения онколитического MV. В частности, был клонирован человеческий ген, кодирующий йодид-симпортерный белок (NIS), в MV-Edm [32]. Белок NIS позволяет визуализировать репликацию *in situ* онколитического вируса в паренхиме глиом с помощью гамма-камеры после системного введения радиоактивных изотопов ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I или ^{131}I , которые накапливаются в инфициро-

ванных опухолевых клетках. NIS-модифицированный MV был протестирован в доклинических исследованиях [32]. Было показано, что терапевтический эффект MV увеличивается за счет лучевой терапии путем локального накопления ^{131}I . На моделях мышей NIS-модифицированный вирус увеличивал их выживаемость и в то же время цитопатический эффект по сравнению с MV-CEA. MV-CEA – другой модифицированный MV-Edm, кодирующий карциноэмбриональный антиген (CEA), для отслеживания вирусной репликации в клетках глиомы *in vivo* с помощью анализа крови, поскольку этот фактор высвобождается и обнаруживается в крови. На животных моделях был показан значительный регресс опухоли после внутриопухолевого введения MV-CEA.

Фаза I клинических испытаний с использованием MV-CEA для терапии ГБМ была проведена на 23 пациентах с рецидивами. Одна группа получала вирус непосредственно в резекционную полость, а другая группа – непосредственно перед операцией через катетер. Не наблюдали значительных различий между группами в выживаемости без прогрессирования заболевания в течение 6 месяцев (NCT00390299).

Таким образом, введение маркерных генов в состав генома вируса позволяет также оценить эффективность выбранного терапевтического подхода.

MV-GFP-H_{AA}-scEGFR представляет собой перетаргетированный вирус, экспрессирующий одноцепочечное антитело на С-конце Н-белка, которое связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR). Гиперэкспрессия EGFR характерна для клеток ГБМ, что определяет специфичность MV-GFP-H_{AA}-scEGFR. *In vivo* был показан значительный регресс и индукция апоптоза клеток, инфицированных MV-GFP-H_{AA}-scEGFR. При этом введение MV-GFP-H_{AA}-scEGFR в центральную нервную систему мышей, экспрессирующих CD46, не приводило к нейротоксичности [33].

MV-141.7 и MV-AC133 – еще одни рекомбинантные вирусы, перетаргетированные на рецептор CD133. CD133 часто экспрессируется клетками ГБМ. Введение вируса MV-141.7 в мышей с ортотопической глиомой приводило к большей выживаемости по сравнению с немодифицированным вирусом [34]. Кроме того, комбинирование подходов по ретаргетингу на CD133 и армированию вируса кори SCD показывает большую безопасность и высокую специфичность к лизису CD133-положительных клеток по сравнению с модифицированным вирусом везикулярного стоматита в ортотопической модели глиомы [35].

Преодоление противовирусного иммунитета

Несмотря на то, что онколитические MV обладают многими преимуществами в качестве терапевтического средства, наличие нейтрализующих антител препятствует их широкому применению. Благодаря наличию безопасных и эффективных вакцин против кори

в календаре прививок многие онкологические больные имеют значительные уровни нейтрализующих антител (nAbs) против MV в плазме крови. Это создает проблему для системного введения онколитического вируса, поскольку нейтрализующие антитела могут связывать MV до того, как он достигнет опухоли.

Однако существует несколько стратегий, позволяющих обойти это потенциальное препятствие. Например, модификация эпитопов белка Н MV демонстрирует противоопухолевую эффективность даже при наличии антител [36]. Другой подход заключается в экранировании – использовании полимеров полиэтиленimina [37], а также его комбинации с оксидом графена [38], чтобы скрыть поверхность вириона от нейтрализации с помощью nAbs.

Еще один вариант системной доставки онколитических MV к опухоли и ее метастазам – использование клеток-носителей. В качестве потенциальных вирусных носителей были предложены различные типы клеток, включая непосредственно злокачественные клетки, стволовые клетки, незрелые и созревшие дендритные клетки, активированные Т-лимфоциты, мононуклеарные клетки периферической крови [39–41].

Адаптивность использования MV дает возможность для синергии с другими методами иммунотерапии. Так, комбинация опухолевых клеток, предварительно инфицированных MV, с аутологичными вакцинами на основе дендритных клеток (ДК) способна преодолеть проблему опухолевого барьера и активировать противоопухолевый иммунитет [42].

Сочетание с другими методами лечения

Следующим логическим шагом станет комбинация онколитического вируса с ингибиторами контрольных точек, что позволит преодолеть иммуносупрессию опухоли и ее микроокружения. Онколитические вирусы привлекают цитотоксичные Т-лимфоциты к опухоли и регулируют экспрессию PD-L1 как на клетках ГБМ, так и на иммунных клетках, что делает их идеальным кандидатом для комбинаций [43]. III фаза клинических испытаний антител против PD-L1 в лечении ГБМ (NCT02017717) показали обнадеживающую эффективность и безопасность у резистентных к консервативной терапии больных. Согласно исследованию, у 88 % пациентов с первичными ГБМ и 72,2 % рецидивирующими ГБМ наблюдали экспрессию PD-L1 [44]. Однако, хотя большинство ГБМ экспрессируют PD-L1, их уровни остаются низкими (примерно 2,7 %). Кроме того, экспрессия PD-1 также наблюдается в других клетках, инфильтрирующих опухоль. Известна обратная корреляция между экспрессией PD-L1 и прогнозом, что предполагает иммунодепрессивное действие PD-1+ Т-клеток в микроокружении ГБМ [45]. Активация STAT3, индуцированная IL-10 в связанных с опухолью макрофагах, может поддерживать высокий уровень PD-L1, что приводит к противовоспалитель-

ному состоянию M2 макрофагов, которое непосредственно подавляет активацию Т-клеток, опосредуя иммуносупрессирующее микроокружение [46]. Таким образом, комбинационное использование вирусов и антител против PD-L1 может иметь синергические эффекты при терапии ГБМ.

Проведенные исследования показывают, что MV, усиленный вставками последовательностей PD-L1 и CTLA-4, во-первых, способен индуцировать синтез антител, а во-вторых, существенно повышает ответ на виротерапию в иммунокомпетентной модели меланомы мышей [47]. Это доказывает, что в будущем возможно применение такой комбинации в качестве монотерапии.

Следует также отметить, что антитела (α EGFR, α IFN, α PD1, α CTLA4), иммунные клетки (CD8+NKG2D+, NK), ингибиторы различных клеточных сигнальных путей и другие стратегии терапии, такие как лучевая, химиотерапия или комбинация с другими терапевтическими вирусами, были протестированы в ряде исследований, выявив различную степень синергизма [48]. Так, комбинация онколитического MV с активированными НК-клетками привела к увеличению высвобождения цитолитических ферментов НК-клетками и, как следствие, ускорению гибели опухолевых клеток по сравнению с монотерапией *in vitro* [49]. С другой стороны, одновременное введение активированных НК-клеток и реплицирующихся онколитических вирусов может снижать терапевтический потенциал последних, за счет их элиминации НК-клетками [50]. Однако, стратегия использования MV, кодирующего интерлейкин-12 (MeVac FmIL-12) и интерлейкин-15 (MeVac FmIL-15), позволяет избежать элиминацию вируса, вместе с тем, опосредует усиление Т- и НК-клеточный ответ и, таким образом, увеличивает терапевтическую эффективность, особенно в опухолях, контролируемых НК-клетками. Инфекция вирусом MeVac FmIL-15 увеличивала инфильтрацию опухоли Т- и НК-клетками. Однако для вируса MeVac FmIL-12 были характерны более устойчивая экспрессия вирусных генов и активация иммунной системы, и, соответственно, большая противоопухолевая эффективность [51].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Онколитическая вирусная иммунотерапия – многообещающий подход в лечении солидных опухолей головного мозга, в первую очередь, мультиформной глиобластомы. Аттенуированный вирус кори представляется удобной и безопасной платформой иммунотерапии, позволяющей нацеливать вирус на неоантигены опухоли. Кроме того, возможность усиливать вирус за счет внедрения в геном последовательностей, кодирующих цитокины, ингибиторы иммунных контрольных точек и другие молекулы, обеспечивает гибкость и эффективность предложенного терапевтического подхода на основе вируса кори в качестве векторной платформы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lichty B. D., Breitbach C. J., Stojdl D. F., Bell J. C. Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(8):559–567. DOI: 10.1038/nrc3770.
- Pidelaserra-Martí G., Engeland C. E. Mechanisms of measles virus oncolytic immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2020;56:28–38. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2020.07.009.
- Tribe A. K. W., McConnell M. J., Teesdale-Spittle P. H. The Big Picture of Glioblastoma Malignancy: A Meta-Analysis of Glioblastoma Proteomics to Identify Altered Biological Pathways. *ACS Omega*. 2021;6(38):24535–24544. DOI: 10.1021/acsomega.1c02991.
- Estevez-Ordóñez D., Chagoya G., Salehani A., Atchley T. J., Laskey N. M. B., Parr M. S., Elsayed G. A., Mahavadi A. K., Rahm S. P., Friedman G. K., Markert J. M., Immunovirotherapy for the Treatment of Glioblastoma and Other Malignant Gliomas, *Neurosurgery Clinics of North America*. 2021;32(2):265–281. DOI: 10.1016/j.nec.2020.12.008.
- Msaouel P., Opyrchal M., Dispenzieri A., Peng K. W., Federspiel M. J., Russell S. J., Galanis E. Clinical Trials with Oncolytic Measles Virus: Current Status and Future Prospects. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018;18(2):177–187. DOI: 10.2174/1568009617666170222125035.
- Allen C., Opyrchal M., Aderca I., Schroeder M. A., Sarkaria J. N., Domingo E., Federspiel M. J., Galanis E. Oncolytic measles virus strains have significant antitumor activity against glioma stem cells. *Gene Ther*. 2013;20(4):444–449. DOI: 10.1038/gt.2012.62.
- Lin L. T., Richardson C. D. The host cell receptors for measles virus and their interaction with the viral Hemagglutinin (H) Protein. *Viruses*. 2016;8(9):250. DOI: 10.3390/v8090250.
- Ammour Y., Ryabaya O., Shchetinina Y., Prokofeva E., Gavrilova M., Khochonkov D., Vorobyev D., Faizuloev E., Shohin I., Zverev V. V., Svitich O., Nasedkina T. The Susceptibility of Human Melanoma Cells to Infection with the Leningrad-16 Vaccine Strain of Measles Virus. *Viruses*. 2020;12(2):173. DOI: 10.3390/v12020173.
- Stavarakaki E., Dirven C. M. F., Lamfers M. L. M. Personalizing Oncolytic Virotherapy for Glioblastoma: In Search of Biomarkers for Response. *Cancers*. 2021;13(4):614. DOI: 10.3390/cancers13040614.
- Aref S., Castleton A. Z., Bailey K., Burt R., Dey A., Leongamornlert D., Mitchell R. J., Okasha D., Fielding A. K. Type 1 Interferon Responses Underlie Tumor-Selective Replication of Oncolytic Measles Virus. *Mol Ther*. 2020;28(4):1043–1055. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.01.027.
- Kurokawa C., Iankov I. D., Anderson S. K., Aderca I., Leontovich A. A., Maurer M. J., Oberg A. L., Schroeder M. A., Giannini C., Greiner S. M., Becker M. A., Thompson E. A., Haluska P., Jentoft M. E., Parney I. F., Weroha S. J., Jen J., Sarkaria J. N., Galanis E. Constitutive interferon pathway activation in tumors as an efficacy determinant following oncolytic virotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(10):1123–1132. DOI: 10.1093/jnci/djy033.
- Radecke F., Spielhofer P., Schneider H., Kaelin K., Huber M., Dotsch C., Christiansen G., Billeter M. A. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J*. 1995;14(23):5773–5784. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00266.x.
- Heidmeier S., Hanauer J. R. H., Friedrich K., Pruffer S., Schneider I. C., Buchholz C. J., Cichutek K., Muhlebach M. D. A single amino acid substitution in the measles virus F2 protein reciprocally modulates membrane fusion activity in pathogenic and oncolytic strains. *Virus Res*. 2014;180:43–48. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.12.016.
- Haralambieva I., Iankov I., Hasegawa K., Harvey M., Russell S. J., Peng K.-W. Engineering oncolytic measles virus to circumvent the intracellular innate immune response. *Mol Ther*. 2007;15(3):588–597. DOI: 10.1038/SJ.MT.6300076.
- Billeter M. A., Naim H. Y., Udem S. A. Reverse genetics of measles virus and resulting multivalent recombinant vaccines: applications of recombinant measles viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;329:129–162. DOI: 10.1007/978-3-540-70523-9_7.
- Aref S., Bailey K., Fielding A. Measles to the Rescue: A Review of Oncolytic Measles Virus. *Viruses*. 2016;8(10):294. DOI: 10.3390/v8100294.
- Anderson B. D., Nakamura T., Russell S. J., Peng K.-W. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res*. 2004;64(14):4919–4926. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0884.
- Muhlebach M. D. Measles virus in Cancer therapy. *Current Opinion in Virology*. 2020;41:85–97. DOI: 10.1016/j.coviro.2020.07.016.
- Friedrich K., Hanauer J. R., Pruffer S., Munch R. C., Volker I., Filippis C., Jost C., Hanschmann K.-M., Cattaneo R., Peng K.-W., Pluckthun A., Buchholz C. J., Cichutek K., Muhlebach M. D. DARPIn-targeting of measles virus: unique bispecificity, effective oncolysis, and enhanced safety. *Mol Ther*. 2013;21(4):849–859. DOI: 10.1038/mt.2013.16.
- Hammond A. L., Plemper R. K., Zhang J., Schneider U., Russell S. J., Cattaneo R. Single-chain antibody displayed on a recombinant measles virus confers entry through the tumor-associated carcinoembryonic antigen. *J Virol*. 2001;75(5):2087–2096. DOI: 10.1128/JVI.75.5.2087-2096.2001.
- Peng K.-W., Holler P. D., Orr B. A., Kranz D. M., Russell S. J. Targeting virus entry and membrane fusion through specific peptide/MHC complexes using a high-affinity T-cell receptor. *Gene Ther*. 2004;11(15):1234–1239. DOI: 10.1038/sj.gt.3302286.
- Lal S., Raffel C. Using cystine knot proteins as a novel approach to retarget oncolytic measles virus. *Mol Ther Oncolytics*. 2017;7:57–66. DOI: 10.1016/j.omto.2017.09.005.
- Hanauer J. R., Gottschlich L., Riehl D., Rusch T., Koch V., Friedrich K., Hutzler S., Pruffer S., Friedel T., Hanschmann K.-M., Munch R. C., Jost C., Pluckthun A., Cichutek K., Buchholz C. J., Muhlebach M. D. Enhanced lysis by bispecific oncolytic measles viruses simultaneously using HER2/neu or EpCAM as target receptors. *Mol Ther Oncolytics*. 2016;3:16003. DOI: 10.1038/mto.2016.3.
- Maisner A., Mrkic B., Herrler G., Moll M., Billeter M. A., Cattaneo R., Klenk H. D. Recombinant measles virus requiring an exogenous protease for activation of infectivity. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 2):441–449. DOI: 10.1099/0022-1317-81-2-441.
- Leber M. F., Baertsch M.-A., Anker S. C., Henkel L., Singh H. M., Bossow S., Engeland C. E., Barkley R., Hoyle B., Albert J., Springfield C., Jager D., von Kalle C., Ungerechts G. Enhanced control of oncolytic measles virus using MicroRNA target sites. *Mol Ther Oncolytics*. 2018;9:30–40. DOI: 10.1016/j.omto.2018.04.002.
- Grossardt C., Engeland C. E., Bossow S., Halama N., Zaoui K., Leber M. F., Springfield C., Jaeger D., von Kalle C., Ungerechts G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic measles virus is an effective therapeutic cancer vaccine. *Hum Gene Ther*. 2013;24(7):644–654. DOI: 10.1089/hum.2012.205.
- Achard C., Guillerme J.-B., Bruni D., Boisgerault N., Combredet C., Tangy F., Jouvenet N., Gregoire M., Fonteneau J.-F. Oncolytic measles virus induces tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology*. 2016;6(1):e1261240. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1261240.
- Klose C., Berchtold S., Schmidt M., Beil J., Smirnow I., Venturelli S., Burkard M., Handgretinger R., Lauer U. M. Biological treatment of pediatric sarcomas by combined virotherapy and NK cell therapy. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1172. DOI: 10.1186/s12885-019-6387-5.
- Gauvrit A., Brandler S., Sapède-Pérez C., Boisgerault N., Tangy F., Gregoire M. Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res*. 2008;68(12):4882–4892. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6265.
- Muhlebach M. D. Vaccine platform recombinant measles virus. *Virus Genes*. 2017;53(5):733–740. DOI: 10.1007/s11262-017-1486-3.

31. Pliquet E., Ruffie C., Escande M., Thalmensi J., Najburg V., Combredet C., Bestetti T., Julithe M., Liard C., Huet T., Wain-Hobson S., Tanguy F., Langlade-Demoyen P. Strong antigen-specific T-cell immunity induced by a recombinant human TERT measles virus vaccine and amplified by a DNA/ viral vector prime boost in IFNAR/CD46 mice. *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68(4):533–544. DOI: 10.1007/s00262-018-2272-3.
32. Opyrchal M., Allen C., Iankov I., Aderca I., Schroeder M., Sarkaria J., Galanis E. Effective radiovirotherapy for malignant gliomas by using oncolytic measles virus strains encoding the sodium iodide symporter (MV-NIS). *Hum Gene Ther.* 2012;23(4):419–427. DOI: 10.1089/hum.2011.158.
33. Paraskevaku G., Allen C., Nakamura T., Zollman P., James C. D., Peng K. W., Schroeder M., Russell S. J., Galanis E. Epidermal growth factor receptor (EGFR)-retargeted measles virus strains effectively target EGFR or EGFRvIII expressing gliomas. *Mol Ther.* 2007;15(4):677–686. DOI: 10.1038/sj.mt.6300105.
34. Bach P., Abel T., Homann C., Gal Z., Braun G., Voelker I., Ball C. R., Johnston I. C. D., Lauer U. M., Herold-Mende C., Mühlebach M. D., Glimm H., Buchholz C. J. Specific elimination of CD133⁺ tumor cells with targeted oncolytic measles virus. *Cancer Res.* 2013;73(2):865–874. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2221.
35. Kleinlützum D., Hanauer J. D. S., Muik A., Hanschmann K.-M., Kays S.-K., Ayala-Breton C., Peng K.-W., Mühlebach M. D., Abel T., Buchholz C. J. Enhancing the Oncolytic Activity of CD133-Targeted Measles Virus: Receptor Extension or Chimerism with Vesicular Stomatitis Virus Are Most Effective. *Front Oncol.* 2017;7:127. DOI: 10.3389/fonc.2017.00127.
36. Miest T. S., Yaiw K.-C., Frenzke M., Lampe J., Hudacek A. W., Springfield C., von Messling V., Ungerechts G., Cattaneo R. Envelope-chimeric entry-targeted measles virus escapes neutralization and achieves oncolysis. *Mol Ther.* 2011;19(10):1813–1820. DOI: 10.1038/mt.2011.92.
37. Nosaki K., Hamada K., Takashima Y., Sagara M., Matsumura Y., Miyamoto S., Hijikata Y., Okazaki T., Nakanishi Y., Tani K. A novel, polymer-coated oncolytic measles virus overcomes immune suppression and induces robust antitumor activity. *Mol Ther Oncolytics.* 2016;3:16022. DOI: 10.1038/mt.2016.22.
38. Xia M., Luo D., Dong J., Zheng M., Meng G., Wu J., Wei J. Graphene oxide arms oncolytic measles virus for improved effectiveness of cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):408. DOI: 10.1186/s13046-019-1410-x.
39. Ong H. T., Hasegawa K., Dietz A. B., Russell S. J., Peng K.-W. Evaluation of T cells as carriers for systemic measles virotherapy in the presence of antiviral antibodies. *Gene Ther.* 2007;14(4):324–333. DOI: 10.1038/sj.gt.3302880.
40. Miest T. S., Frenzke M., Cattaneo R. Measles virus entry through the signaling lymphocyte activation molecule governs efficacy of mantle cell lymphoma radiovirotherapy. *Mol Ther.* 2013;21(11):2019–2031. DOI: 10.1038/mt.2013.171.
41. Prins R. M., Wang X., Soto H., Young E., Lisiero D. N., Fong B., Everson R., Yong W. H., Lai A., Li G., Cloughesy T. F., Liao L. M. Comparison of glioma-associated antigen peptide-loaded versus autologous tumor lysate-loaded dendritic cell vaccination in malignant glioma patients. *J Immunother.* 2013;36(2):152–157. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3182811ae4.
42. Steinman R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:1–22. DOI: 10.1146/annurev-immunol-100311-102839.
43. Hardcastle J., Mills L., Malo C. S., Jin F., Kurokawa C., Geekiyanage H., Schroeder M., Sarkaria J., Johnson A. J., Galanis E. Immunovirotherapy with measles virus strains in combination with anti-PD-1 antibody blockade enhances antitumor activity in glioblastoma treatment. *Neuro-Oncology.* 2017;19(4):493–502. DOI: 10.1093/neuonc/nov179.
44. Berghoff A. S., Kiesel B., Widhalm G., Rajky O., Ricken G., Wöhrer A., Dieckmann K., Filipits M., Brandstetter A., Weller M., Kurscheid S., Hegi M. E., Zielinski C. C., Marosi C., Hainfellner J. A., Preusser M., Wick W. Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2015;17(8):1064–1075. DOI: 10.1093/neuonc/nou307.
45. Nduom E. K., Wei J., Yaghi N. K., Huang N., Kong L. Y., Gabrusiewicz K., Ling X., Zhou S., Ivan C., Chen J. Q., Burks J. K., Fuller G. N., Calin G. A., Conrad C. A., Creasy C., Ritthipichai K., Radvanyi L., Heimberger A. B. PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2016;18(2):195–205. DOI: 10.1093/neuonc/nov172.
46. Bloch O., Crane C. A., Kaur R., Safaei M., Rutkowski M. J., Parsa A. T. Gliomas promote immunosuppression through induction of B7-H1 expression in tumor-associated macrophages. *Clin Cancer Res.* 2013;19(12):3165–3175. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3314.
47. Engeland C. E., Grossardt C., Veinalde R., Bossow S., Lutz D., Kaufmann J. K., Shevchenko I., Umansky V., Nettelbeck D. M., Weichert W., Jäger D., von Kall C., Ungerechts G. CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Mol Ther.* 2014;22(11):1949–1959. DOI: 10.1038/mt.2014.160.
48. Leber M. F., Neault S., Jirovec E., Barkley R., Said A., Bell J. C., Ungerechts G. Engineering and combining oncolytic measles virus for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020;56:39–48. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2020.07.005.
49. Klose C., Berchtold S., Schmidt M., Beil J., Smirnow I., Venturelli S., Burkard M., Handgretinger R., Lauer U. M. Biological treatment of pediatric sarcomas by combined virotherapy and NK cell therapy. *BMC Cancer.* 2019;19(1):1172. DOI: 10.1186/s12885-019-6387-5.
50. Leung E. Y. L., McNeish I. A. Strategies to Optimise Oncolytic Viral Therapies: The Role of Natural Killer Cells. *Viruses.* 2021;13(8):1450. DOI: org/10.3390/v13081450.
51. Backhaus P. S., Veinalde R., Hartmann L., Dunder J. E., Jeworowski L. M., Albert J., Hoyler B., Poth T., Jäger D., Ungerechts G., Engeland C. E. Immunological Effects and Viral Gene Expression Determine the Efficacy of Oncolytic Measles Vaccines Encoding IL-12 or IL-15 Agonists. *Viruses.* 2019;11(10):914. DOI: 10.3390/v11100914.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-59-67>
УДК 615.454.1



Оригинальная статья / Research article

Перенос технологии косметического эмульсионного крема с лабораторной на пилотную фазу

М. А. Буракова, О. Н. Абросимова*, Ю. М. Ладутько, И. Е. Смехова

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

*Контактное лицо: Абросимова Олеся Николаевна. E-mail: olesya.abrosimova@pharminnotech.com

ORCID: М. А. Буракова – <https://orcid.org/0000-0002-3880-0359>; О. Н. Абросимова – <https://orcid.org/0000-0002-0274-0139>;
Ю. М. Ладутько – <https://orcid.org/0000-0001-5741-4050>; И. Е. Смехова – <https://orcid.org/0000-0002-0013-4784>.

Статья поступила: 13.07.2021

Статья принята в печать: 14.01.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. При переносе технологии косметического эмульсионного крема из лабораторных условий на полупромышленное оборудование необходимо определить критические показатели процесса, которые позволят достигнуть результатов без потери качества конечного продукта.

Цель. Цель исследования – подтверждение эффективности разработанной технологии производства эмульсионного крема в условиях масштабирования.

Материалы и методы. В качестве активных веществ использовали бадана толстолистного экстракт сухой, салициловую кислоту, диметикон, ментол и октипирокс; эмоленов – масло виноградных косточек, кокосовое масло, касторовое масло; эмульгаторов и со-эмульгаторов – моноглицериды дистиллированные, воск эмульсионный, ланолин безводный, кремофор А25; увлажнителя – глицерин; щелочного агента, регулятора pH – триэтаноламин; консерванта – Эуксил 9010; ароматизатора – эфирное масло розового дерева, растворителя – вода очищенная. Смешение фаз и эмульгирование осуществляли в установке с планетарной мешалкой PRS AR 403 (ERWEKA GmbH, Германия), дозирование в герметичную пластиковую тару – на установке дозирования мазей FDS II AR 403 (ERWEKA GmbH, Германия). Исследование физико-химических и структурно-механических свойств крема проводили согласно ГОСТ 29188.2-2014 и ГОСТ 29188.3-91.

Результаты и обсуждение. В условиях масштабирования наработано 3 пилотных серии косметического эмульсионного крема для профилактики сухой себореи кожи головы на основе бадана толстолистного экстракта сухого. Крем, полученный как в пилотную, так и лабораторную фазы, соответствовал всем требованиям Технического регламента Таможенного союза (ТР ТС) 009/2011 «О безопасности парфюмерно-косметической продукции», что подтверждает воспроизводимость разработанной технологии производства. Увеличение загрузки в 20 раз не влияло на способы введения компонентов и их процентное соотношение. Для определения возможности переноса технологии из условий лаборатории в условия полупромышленного производства были проанализированы технологические характеристики оборудования на способность осуществить требуемый технологический процесс, с помощью диаграммы Исикавы определены риски и установлены причинно-следственные связи процесса производства. Установлены наиболее важные показатели технологического процесса – это температура, количество оборотов мешалки и время перемешивания.

Заключение. На полупромышленном оборудовании GMP тренинг-центра осуществлено масштабирование технологии получения косметического эмульсионного крема на основе бадана толстолистного экстракта сухого. Составлена причинно-следственная диаграмма (диаграмма Исикавы). Учет возможных рисков при производстве эмульсионного крема (число оборотов мешалки, время перемешивания, температура) позволил получить стабильный продукт, соответствующий всем требованиям ТР ТС 009/2011 «О безопасности парфюмерно-косметической продукции». Показана воспроизводимость технологического процесса.

Ключевые слова: эмульсионный крем, масштабирование, перенос технологии, воспроизводимость, диаграмма Исикавы

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. М. А. Буракова, О. Н. Абросимова, Ю. М. Ладутько, И. Е. Смехова – постановка задачи, выполнение эксперимента, обработка полученных данных, обсуждение результатов и написание текста статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования центра коллективного пользования «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Буракова М. А., Абросимова О. Н., Ладутько Ю. М., Смехова И. Е. Перенос технологии косметического эмульсионного крема с лабораторной на пилотную фазу. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):59–67. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-59-67>

Transfer of Cosmetic Emulsion Cream Technology from Laboratory to Pilot Phase

Marina A. Burakova, Olesya N. Abrosimova*, Yulia M. Ladutko, Irina E. Smekhova

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

*Corresponding author: Olesya N. Abrosimova. E-mail: olesya.abrosimova@pharminnotech.com

ORCID: Marina A. Burakova – <https://orcid.org/0000-0002-3880-0359>; Olesya N. Abrosimova – <https://orcid.org/0000-0002-0274-0139>;
Yulia M. Ladutko – <https://orcid.org/0000-0001-5741-4050>; Irina E. Smekhova – <https://orcid.org/0000-0002-0013-4784>.

Received: 13.07.2021

Revised: 14.01.2022

Published: 25.02.2022

© Буракова М. А., Абросимова О. Н., Ладутько Ю. М., Смехова И. Е., 2022

© Burakova M. A., Abrosimova O. N., Ladutko Yu. M., Smekhova I. E., 2022

Abstract

Introduction. When transferring the technology of cosmetic emulsion cream from laboratory conditions to semi-industrial equipment, it is necessary to determine the critical process parameters that will allow achieving results without losing the quality of the final product.

Aim. The aim of the study is to confirm the effectiveness of the developed technology for the production of emulsion cream under scaling conditions.

Materials and methods. As active substances were used badan thick-leaved extract dry, salicylic acid, dimethicone, menthol and octylpyrox; emollients – grape seed oil, coconut oil, castor oil; emulsifiers and co-emulsifiers – distilled monoglycerides, emulsion wax, anhydrous lanolin, Cremophor A25; humidifier – glycerin; alkaline agent, pH regulator – triethanolamine; preservative – Euxil 9010; fragrance – essential oil of rosewood, solvent – purified water. Phase mixing and emulsification were carried out in a PRS AR 403 planetary mixer (ERWEKA GmbH, Germany), dosing into a sealed plastic container was carried on an FDS II AR 403 ointment dosing unit (ERWEKA GmbH, Germany). The study of the physicochemical and structural-mechanical properties of the cream was carried out in accordance with GOST 29188.2-2014 and GOST 29188.3-91.

Results and discussion. Under scaling conditions, 3 pilot series of cosmetic emulsion cream for the prevention of dry seborrhea of the scalp based on badan thick-leaved extract dry have been developed. The cream obtained both in the pilot and laboratory phases met all the requirements of the Technical Regulations of the Customs Union (TR CU) 009/2011 "On the safety of perfumery and cosmetic products", which confirms the reproducibility of the developed production technology. A 20-fold increase in loading did not affect the methods of introducing the components and their percentage. To determine the possibility of technology transfer from laboratory conditions to semi-industrial production conditions, the technological characteristics of the equipment were analyzed for the ability to carry out the required technological process, using the Ishikawa diagram, risks were identified and causal relationships of the production. The most important indicators of the technological process have been established – these are the temperature, the number of revolutions of the mixer and the mixing time.

Conclusion. On the semi-industrial equipment of the GMP training center, the technology of obtaining a cosmetic emulsion cream based on badan thick-leaved extract dry. A causal diagram (Ishikawa diagram) was compiled. Taking into account possible risks in the production of emulsion cream (number of revolutions of the mixer, stirring time, temperature) made it possible to obtain a stable product that meets all the requirements of TR CU 009/2011 "On the safety of perfumery and cosmetic products". The reproducibility of the technological process is shown.

Keywords: emulsion cream, scaling, technology transfer, reproducibility, Ishikawa diagram

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Marina A. Burakova, Olesya N. Abrosimova, Yulia M. Ladutko, Irina E. Smekhova — statement of the problem, implementation of the experiment, processing of obtained data, discussion of the results, and writing the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the collective use center "Analytical Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education of the SPbPhU of the Ministry of Health of Russia" in the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Burakova M. A., Abrosimova O. N., Ladutko Yu. M., Smekhova I. E. Transfer of cosmetic emulsion cream technology from laboratory to pilot phase. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):59–67. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-59-67>

ВВЕДЕНИЕ

Среди кремов эмульсионные крема занимают первое место по объему производства [1]. Наличие в эмульсионном креме определенного количества воды в некоторой степени по сравнению с мазями улучшает его лечебно-профилактическое действие благодаря повышению степени дисперсности полезных компонентов и значительному увеличению скорости всасывания их в кожу. Поэтому в отечественной и мировой практике крема на жировой основе вытесняются эмульсионными. За рубежом особенно распространены жидкие кремы, состоящие приблизительно из 20 % жировых веществ и 80 % воды. Несмотря на пониженное содержание жиров и жироподобных веществ, физиологические свойства жидких эмульсий по воздействию на кожу не уступают кремам с более высоким содержанием жиров [2, 3].

Ранее в лабораторных условиях нами была разработана технология эмульсионного крема для про-

филактики сухой себореи кожи головы на основе бадана толстолистного экстракта сухого, которая позволяла получать косметический крем, отвечающий всем требованиям ТР ТС 009/2011 «О безопасности парфюмерно-косметической продукции» [4], однако, при масштабировании процесса могут возникнуть проблемы, такие как нарушение стабильности эмульсии. В процессе хранения стабильность продукта может повлиять не только на потребительские свойства, но и на показатели безопасности продукта. Расслоение, изменение внешнего вида, цвета, запаха и вязкости – это основные видимые признаки нестабильности, которые могут косвенно указывать на нарушение показателей безопасности. Нарушение технологических режимов в процессе промышленного выпуска может привести не только к расслоению и изменению вязкости, но и к изменению водородного показателя, а также к микробиологическому заражению продукта [5].

Однако этого можно избежать, если на этапе разработки будут определены критические показатели процесса и критические показатели качества продукции [6–10]. В описании производственного процесса должен быть указан соответствующий тип оборудования и перечень параметров процесса, которые были обоснованы на этапе фармацевтической разработки [11]. Важно, чтобы продукт, произведенный в небольших количествах, обладал теми же свойствами и характеристиками, что и продукт, произведенный в ходе гораздо более крупных серий. На различных этапах процесса масштабирования – от небольших партий в лабораторном масштабе до партий полного цикла производства – обычно проводится оптимизация процессов в исследованиях фармацевтического производства и проверка качества, чтобы гарантировать, что масштабирование не повлияет на качество и/или эффективность [12–15]. Понимание процесса, его надежное масштабирование и создание системы мониторинга при серийном производстве возможны, если при фармацевтической разработке используется качественное оборудование, соответствующее своему назначению и моделирующее опытно-промышленное и промышленное оборудование [16–18].

Цель. Цель исследования – подтверждение воспроизводимости разработанной технологии производства эмульсионного крема в условиях масштабирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Масло виноградных косточек (торговая марка Casa Rinaldi, Alis S.r.l, Италия), кокосовое масло (СТО 00336444.008-2015, группа компаний «НМЖК», Россия), касторовое масло (АО «ЛенРеактив», CAS №: 8001-79-4, Россия), моноглицериды дистиллированные (МГД) (ТУ 9145-357-00334623-2003, группа компаний «НМЖК», Россия), эмульсионный воск Remiwx 1001 (Россия), ланолин безводный (CAS №: 8006-54-0, АО «ЛенРеактив», Россия), глицерин (CAS №: 56-81-5, АО «ЛенРеактив», Россия), бада толстолистного экстракт сухой (ООО «Казанский завод экстрактов», Россия), кремофор А25 (CAS №: 61791-12-6, BASF, Германия), салициловая кислота (CAS №: 69-72-7, АО «ЛенРеактив», Россия), диметикон (LINDERA, Германия), триэтаноламин (ТЭА) (ТУ 6-09-2448-91, АО «ЛенРеактив», Россия), эуксил 9010 (LINDERA, Германия), ментол (CAS: 2216-51-5, ООО «НеваРеактив», Россия), эфирное масло розового дерева (ООО «Мирролла», Россия), октопирокс [пироктон оламин (интернет-магазин Aromati.ru, Россия)].

Методы

1. Получение эмульсионного крема в лабораторных условиях

Приготовление водной фазы: в выпарительную чашечку помещают требуемое количество воды очищенной, ТЭА и глицерин, нагревают до 80 °С на водя-

ной бане, перемешивают стеклянной палочкой до однородного состояния.

Приготовление масляной фазы: в выпарительную чашечку помещают взвешенные масло виноградных косточек, кокосовое масло, касторовое масло, ланолин, воск эмульсионный, МГД, кремофор А25 и расплавляют на водяной бане при температуре 80 °С.

Затем в масляную фазу, разогретую до температуры 80 °С, частями добавляют водную фазу при постоянном перемешивании, далее гомогенизируют при помощи погружного блендера (Bosch GmbH, Германия), скорость вращения мешалки – 1000 об/мин.

Полученную эмульсию охлаждают при помощи ледяной бани до 30 °С и вносят октопирокс, бада толстолистного экстракт сухой (предварительно растворенный в 5 мл водно-глицериновой смеси 2:1), салициловую кислоту, диметикон, ментол, Эуксил 9010, эфирное масло розового дерева, повторно гомогенизируют до однородной массы в течение 5 мин.

Получение эмульсионного крема представлено на схеме 1.

Масса эмульсионного крема, полученного в лабораторных условиях, составляла 98,0 (выход 98 %).

2. Получение эмульсионного крема в условиях масштабирования

Получение эмульсионного крема в условиях масштабирования осуществляли в GMP тренинг-центре Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета на участке мягких лекарственных форм согласно схеме 1 для лабораторных условий.

Технология включала следующие основные операции:

1. Приготовление водной фазы.

Взвешивают в промежуточную емкость вместимостью 2 литра на лабораторных весах LA16001S (Sartorius, Германия) рассчитанное количество воды очищенной, нагретой до температуры 80 °С. К ней добавляют глицерин, ТЭА и перемешивают при помощи мешалки с верхним приводом Heidolph RZR 2020 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия) в течение 5 мин при 400 об/мин. Передают на операцию «Смешение фаз, эмульгирование».

2. Приготовление масляной фазы.

Взвешивают в промежуточную емкость вместимостью 1 литр на лабораторных весах LA16001S (Sartorius, Германия) рассчитанное количество масла виноградных косточек, кокосового масла, ланолина безводного, МГД, эмульсионного воска, кремофора А25, диметикона. Промежуточную емкость с содержимым нагревают на водяной бане с циркуляцией LCB-11D (Daihan Labtech, Южная Корея) до температуры 80 °С до полного расплавления компонентов. Передают на операцию «Смешение фаз, эмульгирование».

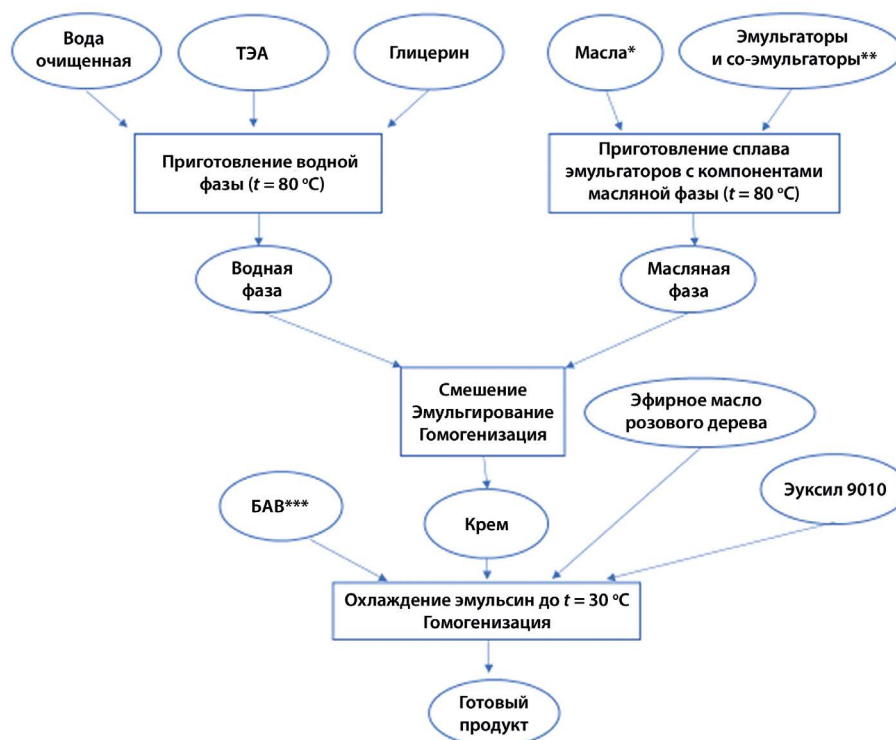
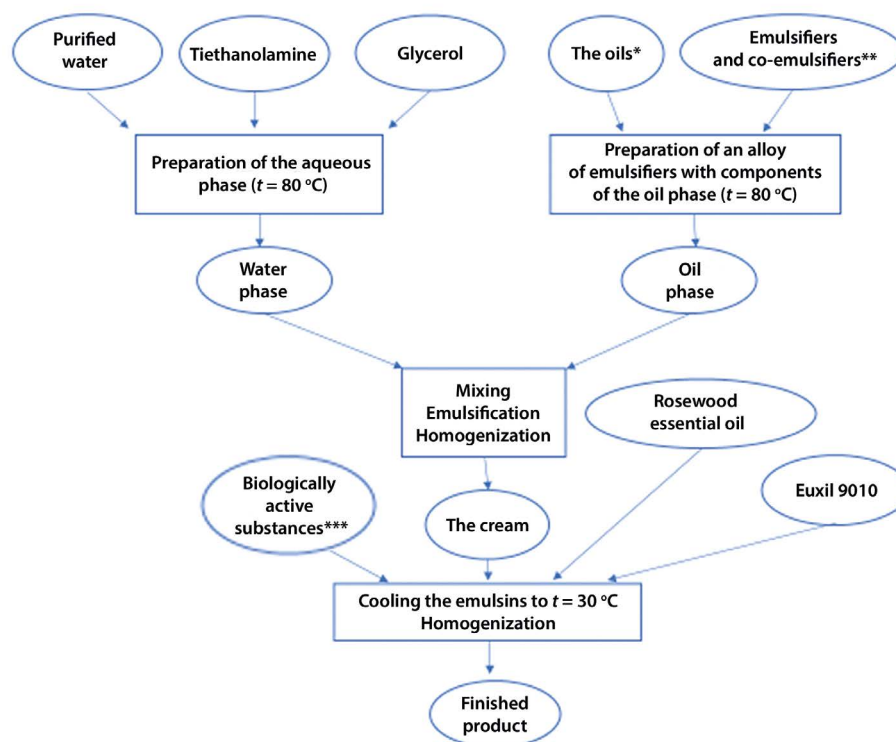


Схема 1. Процессуальная схема получения эмульсионного крема в лабораторных условиях.

Примечание. * Масло виноградных косточек, кокосовое масло, касторовое масло.

** Ланолин безводный, воск эмульсионный, МГД, кремофор А25.

*** Октопирокс, бадана толстолистного экстракт сухой, салициловая кислота, диметикон, ментол



Scheme 1. Procedural scheme for obtaining an emulsion cream in laboratory conditions.

Note: * Grape seed oil, coconut oil, castor oil.

** Anhydrous lanolin, emulsion wax, MHD, Cremophor A25.

*** Octopirox, badan thick-leaved extract dry, salicylic acid, dimethicone, menthol

3. Смешение фаз, эмульгирование.

Компоненты водной фазы помещают в емкость объемом 5 литров установки с планетарной мешалкой PRS AR 403 (ERWEKA GmbH, Германия) (рисунок 1), включают привод, устанавливая скорость мешалки 200 об/мин, активируя термopодогрев (температура 40 °C).



Рисунок 1. Установка с планетарной мешалкой PRS AR 403

Figure 1. Plant with planetary stirrer PRS AR 403

Расплавленную и нагретую до температуры 80 °C масляную фазу постепенно приливают к водной фазе в емкость устройства привода универсального с насадкой – планетарной мешалкой PRS AR 403 (ERWEKA GmbH, Германия), осуществляют перемешивание в течение 10 мин со скоростью 200 об/мин. После окончания смешения фаз полученную массу переливают в емкость вместимостью 3 литра для проведения гомогенизации. Полученную массу передают на операцию «Гомогенизация».

4. Гомогенизация.

Для гомогенизации используют мешалку с верхним приводом EUROSTAR 60 digital (IKA, Германия). Процесс гомогенизации осуществляют при температуре 80 °C со скоростью работы мешалки 2000 об/мин 30 минут до однородной консистенции, оценку осуществляют визуально. Затем эмульсию подвергают охлаждению с помощью ледяной бани до 30–35 °C при медленном перемешивании (200 об/мин) в течение 15–20 мин.

5. Внесение БАВ, консерванта, ароматизатора.

В эмульсию при температуре 30–35 °C и перемешивании вводят бадана толстолистного экстракт сухой (предварительно растворенный в 100 мл водно-глицериновой смеси 2:1), эфирное масло розового дерева, салициловую кислоту, октопирокс, ментол, продолжают перемешивание еще в течение 15 мин со скоростью вращения мешалки 2000 об/мин. Затем массу охлаждают до 20–25 °C, передают на операцию «Упаковка».

6. Упаковка.

Полученный крем фасуют по 20,0 в герметичную пластиковую тару на установке дозирования мазей FDS II AR 403 (ERWEKA GmbH, Германия) (рисунок 2).



Рисунок 2. Установка дозирования мазей FDS II AR 403

Figure 2. Dosing unit for ointments FDS II AR 403

В условиях масштабирования было получено 1960,0 эмульсионного крема (выход 98 %).

3. Исследование физико-химических и структурно-механических свойств крема

Определение вязкости – вискозиметр типа Брукфильда МТ 202.1 (Метротекс, Россия) системы коаксиальных цилиндров, шпиндель № 4 (точность $\pm 1,0$ % диапазона, воспроизводимость $\pm 0,2$ %); измерение pH – pH-метр PB-11 (Sartorius, Германия), согласно ГОСТ 29188.2-2014 «Продукция парфюмерно-косметическая. Метод определения водородного показателя pH» [19]; определение коллоидной стабильности – лабораторная центрифуга MPW-351 (MPW Med. Instruments, Польша), согласно ГОСТ 29188.3-91 «Изделия косметические. Методы определения стабильности эмульсии» [20]; определение термической стабильности – термостат IB-15G (Jeio Tech, Корея), согласно ГОСТ 29188.3-91 «Изделия косметические. Методы определения стабильности эмульсии» [20]; определение органолептических показателей – внешнего вида, цвета, однородности и запаха – проводят согласно ГОСТ 29188.0-14 «Продукция парфюмерно-косметическая. Правила приемки, отбор проб, методы органолептических испытаний» [21]; статистическая обработка данных – согласно ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов эксперимента» [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Масштабирование процесса производства является важным процессом при разработке любого продукта. Одной из задач нашего исследования бы-

ло осуществление переноса технологии эмульсионного крема из условий лаборатории в условия полупромышленного производства. Для этого необходимо было провести практическую оценку оборудования на способность осуществить требуемый технологический процесс без снижения качества получаемого продукта, а также провести анализ рисков с помощью диаграммы Исикавы (рисунок 3).

В технологии эмульсионного крема необходимо учитывать риски, которые могут привести к получению нестабильного неоднородного крема, что зависит, в частности, от правильного выбора числа оборотов мешалки, времени перемешивания, а также температуры проведения процесса [23, 24].

В качестве объекта изучения выбран косметический эмульсионный крем, состав которого был разработан ранее. Состав эмульсионного крема и фактическое количество компонентов на загрузку приведены в таблице 1.

В GMP тренинг-центре на участке мягких лекарственных форм были произведены 3 пилотных серии крема на основе бадана толстолистного экстракта сухого, каждая из которых превышала лабораторную в 20 раз [25–27]. Температуру процесса производства крема поддерживали аналогично температуре получения крема в лабораторных условиях, скорость вращения мешалок и длительность процесса были пропорционально увеличены относительно загрузки. На стадиях приготовления водной и масляной фаз, а также на стадии смешения фаз, эмульгирования, внесения БАВ, консервантов, ароматизаторов контролировали внешний вид и однородность, после стадии гомогенизации дополнительно коллоидную и термическую стабильность.

Таблица 1. Состав крема

Table 1. The composition of the cream

№	Компонент Component	Количество на загрузку в лабораторных условиях, г Quantity per load in laboratory conditions, g	Количество на загрузку в пилотной фазе, г Quantity per loading in the pilot phase, g
1	Масло виноградных косточек Grape seed oil	5,0	100,0
2	Кокосовое масло Coconut oil	5,0	100,0
3	МГД Distilled monoglycerides	5,0	100,0
4	Эмульсионный воск Emulsion wax	4,0	80,0
5	Ланолин безводный Lanolin anhydrous	3,0	60,0
6	Глицерин Glycerol	3,0	60,0
7	Бадана толстолистного экстракт сухой Badana thick-leaved extract dry	2,0	40,0
8	Кремофор А25 Cremophor A25	2,0	40,0
9	Салициловая кислота Salicylic acid	2,0	40,0
10	Диметикон Dimethicone	2,0	40,0
11	ТЭА Triethanolamine	0,5	10,0

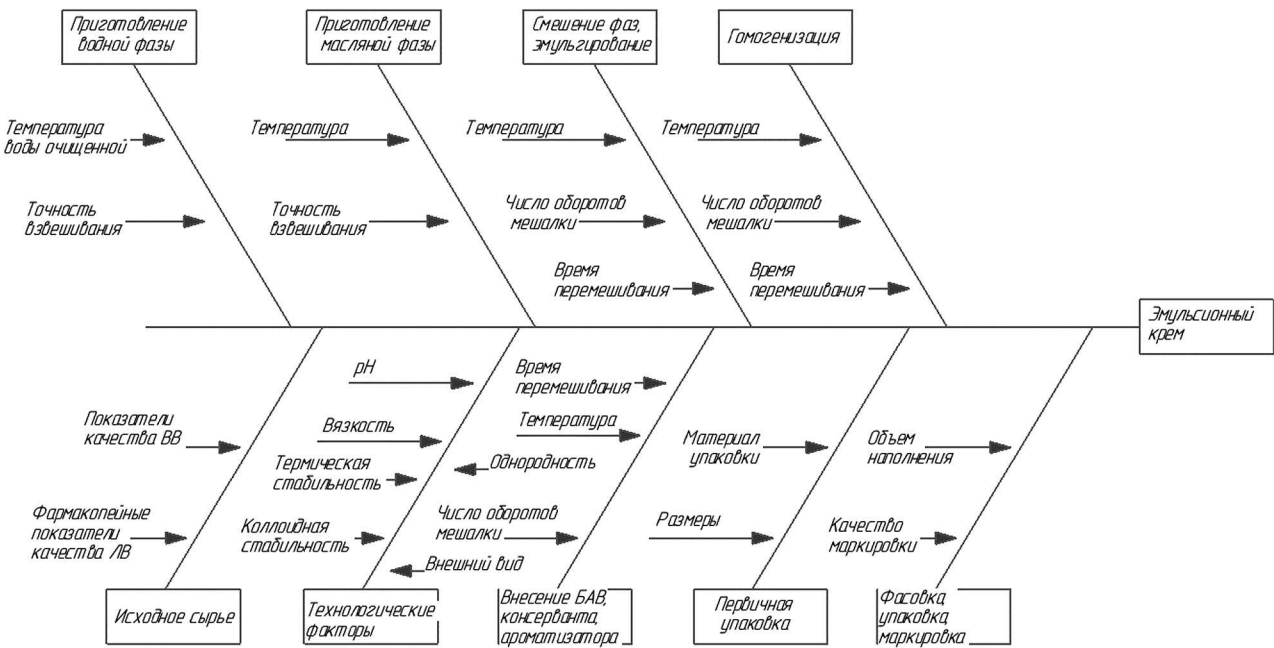


Рисунок 3. Диаграмма Исикавы получения эмульсионного крема

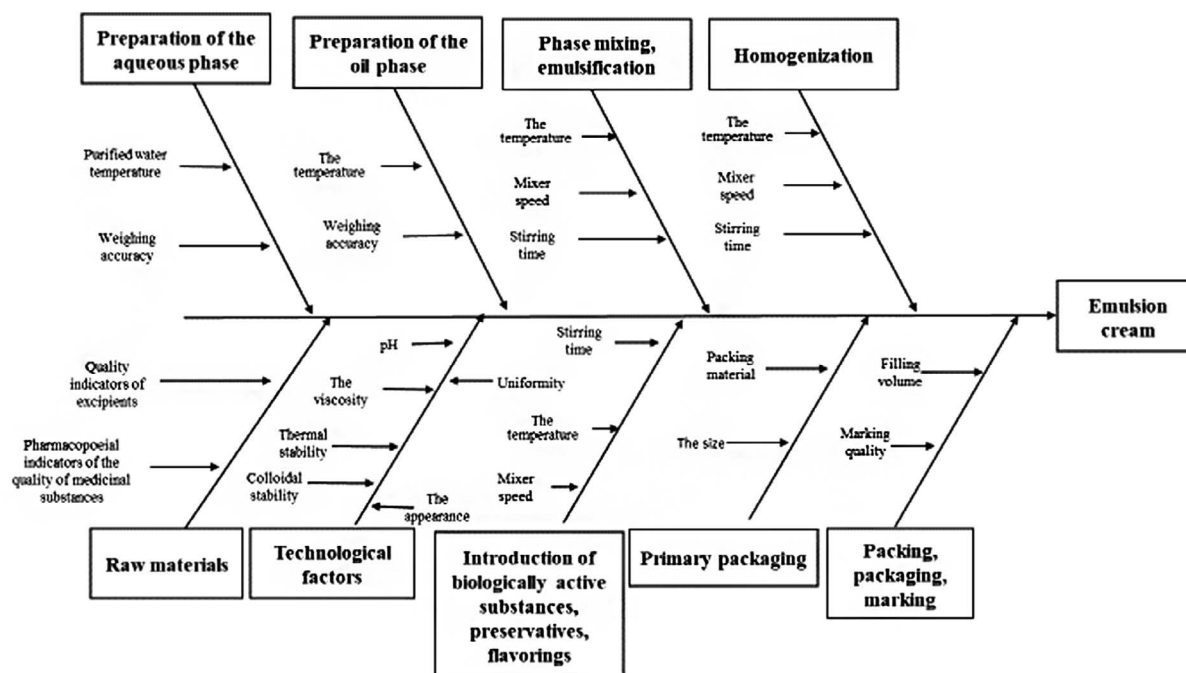


Figure 3. Ishikawa diagram of receiving an emulsion cream

№	Компонент Component	Количество на загрузку в лабораторных условиях, г Quantity per load in laboratory conditions, g	Количество на загрузку в пилотной фазе, г Quantity per loading in the pilot phase, g
12	Эксил 9010 Euxil 9010	0,5	10,0
13	Эфирное масло розового дерева Rosewood essential oil	0,2	4,0
14	Ментол Menthol	0,1	2,0
15	Октопирокс Octopirox	0,1	2,0
16	Вода очищенная Purified water	65,6	1312,0
	Итого: Total:	100,0	2000,0

Полученные серии, а также крем, приготовленный в лабораторных условиях, в соответствии с требованиями ТР ТС 009/2011 [4] были оценены по следующим показателям качества: описание (внешний вид, цвет, запах), величина pH, коллоидная стабильность, термостабильность, вязкость. Результаты проведения стандартизации крема представлены в таблице 2.

Было установлено, что крем, полученный как в лабораторных условиях, так и в пилотную фазу, соответствовал всем требованиям ТР ТС 009/2011 «О безопасности парфюмерно-косметической продук-

ции» [4]. Цвет и запах крема обусловлен входящими в его состав ингредиентами, значение pH укладывается в допустимые нормы. Крем выдерживает испытания на коллоидную и термическую стабильность, значения вязкости существенно не отличаются между разными сериями. Постоянство полученных показателей может свидетельствовать о воспроизводимости разработанной технологии производства эмульсионного крема.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Осуществлено масштабирование технологии получения косметического крема для профилактики сухой себореи кожи головы на основе бадана толстолистного экстракта сухого на полупромышленном оборудовании GMP тренинг-центра, наработано 3 серии, соответствующие всем требованиям ТР ТС 009/2011 «О безопасности парфюмерно-косметической продукции». Составлена причинно-следственная диаграмма (диаграмма Исикавы). Учтены возможные риски (число оборотов мешалки, время перемешивания, температура), что позволило получить стабильный косметический эмульсионный крем. Получен результат, доказывающий воспроизводимость технологического процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анализ российского рынка парфюмерии и косметики. Доступно по: http://www.lawlinks.ru/view_obzors.php?id=4768. Ссылка активна на 10.06.2021.
2. Производство эмульсионных кремов. Доступно по: <http://www.lisyz.ru/tehnologii-proizvodstva/proizvodstvo-emulsionnyh-kremov.html>. Ссылка активна на 10.06.2021.

Таблица 2. Показатели качества крема

Table 2. Indicators of the quality of the cream

Показатель The indicator	Значение из ТР ТС 009/2011 Value from TR TS 009/2011	Экспериментальные значения Experimental values	
		Крем, полученный в лабораторных условиях In vitro cream n = 3	Крем, полученный в пилотную фазу Cream obtained in the pilot phase n = 3
Внешний вид The appearance	Однородная масса, не содержащая посторонних примесей Homogeneous mass, free of impurities	Однородная масса, не содержащая посторонних примесей Homogeneous mass, free of impurities	Однородная масса, не содержащая посторонних примесей Homogeneous mass, free of impurities
Цвет The color	Свойственный цвету данного крема Specific to the color of this cream	Коричневый Brown	Коричневый Brown
Запах The smell	Свойственный запаху данного крема Inherent to the smell of this cream	Сладковатый приятный запах Sweetish pleasant smell	Сладковатый приятный запах Sweetish pleasant smell
Водородный показатель, pH The hydrogen exponent, pH	5,0–9,0	5,68 ± 0,28	5,73 ± 0,22
Коллоидная стабильность The colloidal stability	Стабилен Stable	Стабилен Stable	Стабилен Stable
Термическая стабильность The thermal stability	Стабилен Stable	Стабилен Stable	Стабилен Stable
Вязкость, мПа · с The viscosity, mPa · s	–	22298	22306

- Cizauskaite U., Marks M., Bernatoniene J. The optimization of technological processes, stability and microbiological evaluation of innovative natural ingredients based multiple emulsion. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2018;23:636–645. DOI: 10.1080/10837450.2017.1350981.
- ТР ТС 009/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности парфюмерно-косметической продукции». Доступно по: <http://docs.cntd.ru/document/902303206>. Ссылка активна на 10.06.2021.
- Косметические эмульсии: какие проблемы возникают при разработке и производстве. Доступно по: <https://www.korolevpharm.ru/articles/kosmeticheskie-emulsii-kakie-problemy-voznikayut-pri-razrabotke-i-proizvodstve.html>. Ссылка активна на 10.06.2021.
- ЕМА/CHMP/CVMP/QWP/BWP/70278/2012-Rev 1 Guideline on process validation for finished products – information and data to be provided in regulatory submissions. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-process-validation-finished-products-information-data-be-provided-regulatory-submissions_en.pdf. Accessed: 10.06.2021.
- Рожнова С. А., Цыпкина А. В. Анализ системы организации фармацевтической разработки лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(3):170–176.
- Смехова И. Е., Шигарова Л. В., Наркевич И. А., Флисюк Е. В., Метелева В. Д. Документирование фармацевтической разработки. Часть 2. Документы системы качества. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):147–153. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-147-153
- Reamer A., Ierman L. and Youtie J. Technology Transfer and Commercialization: Their Role in Economic Development. *An overview for pharmaceutical industry*. 2010:1-10.
- Singh Manral M., Prashar B., Sheikh Ya. Technology Transfer in Pharmaceutical Industry; Facts and Steps Involved. *American Journal of PharmTech Research*. 2012;2(4):74–82.
- ЕМА/CHMP/QWP/BWP/245074/2015 Guideline on manufacture of the finished dosage form. 4 July 2017. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-manufacture-finished-dosage-form-revision-1_en.pdf. Accessed: 10.06.2021.
- John R. M. Technology transfer in pharmaceutical industry. *The Pharma Innovation Journal*. 2017;6(3):235–240.
- Waghmare Y. S., Mahapare S. P. The important role of technology transfer in pharmaceutical industry-a review. *World Journal of Pharmaceuticals Research*. 2017;6(9):310–329.
- Mohite P. B., Sangle S. V. Technology transfer in pharmaceutical industry-a review. *International Journal of Advances in Pharmaceutics Research*. 2017;6:1–7.
- Pavithra G. M., Manoranjith, S. Nagalakshmi. An overview of technology transfer as a regulatory aspect. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(2):14–19. DOI: 10.22159/ijap.2021v13i2.40067.
- Ляпунов Н. А., Безуглая Е. П., Ляпунов А. Н., Зинченко И. А., Брылева Е. Ю., Лысокобылка А. А. Лабораторное оборудование на этапе фармацевтической разработки мягких лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(1):29–36. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-29-36.
- Рудько А. И., Конилов Д. Л., Сидоров К. О., Ильинова Ю. Г. Ставка на трансфер: развитие регуляторной базы для развития фармацевтической промышленности. *Фармация*. 2020;69(7):5–9. DOI: 10.29296/25419218-2020-07-01.
- Власенко Ю. В. Проектно-ориентированный подход к разработке готовых лекарственных средств на примере дженерикового многокомпонентного препарата, содержащего амоксициллин и клавулановую кислоту. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(1):30–36.
- ГОСТ 29188.2-2014. Продукция парфюмерно-косметическая. Метод определения водородного показателя pH. Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/1200136164>. Ссылка активна на 10.06.2021.
- ГОСТ 29188.3-91. Изделия косметические. Методы определения стабильности эмульсии. Доступно по: <http://docs.cntd.ru/document/1200022370>. Ссылка активна на 10.06.2021.
- ГОСТ 29188.0-14. Продукция парфюмерно-косметическая. Правила приемки, отбор проб, методы органолептических испытаний. Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/1200136165>. Ссылка активна на 10.06.2021.
- Государственная фармакопея. XIV издания. Доступно по: <https://minzdrav.gov.ru/poleznye-resursy/xiv-izdanie-gosudarstvennoy-farmakopei-rossiyskoy-federatsii>. Ссылка активна на 10.06.2021.
- Strus O., Polovko N., Yezerska O. Justification of technological parameters of the cream production with sapropel extract. *Pharmacia*. 2019;66(1):19–25. DOI: 10.3897/pharmacia.66.e35022.
- Strus O., Polovko N., Plaskonis Y. The investigation of the development of a cream composition with the sapropel extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018;11(7):147–150. DOI: 10.22159/ajpcr.2018.v11i7.23575.

25. Резцов Е., Могилюк В., Рябко Д. Трансфер технологий в фармацевтической отрасли. *Контрактное производство и услуги*. 2010;2:49–52.
26. Береговых В. В., Спицкий О. Р. Перенос технологий при создании производства лекарственного средства. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2013;12:49–57.
27. Technology Transfer. Good Practice Guide. ISPE. 2003. Available at: https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/TransferTechnologyPharmaceuticalManufacturingTRS961Annex7.pdf. Accessed: 10.06.2021.
15. Pavithra G. M., Manoranjith, S. Nagalakshmi. An overview of technology transfer as a regulatory aspect. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(2):14–19. DOI: 10.22159/ijap.2021v13i2.40067.
16. Lyapunov N. A., Bezuglaya E. P., Lyapunov A. N., Zinchenko I. A., Bryleva E. Yu., Lysokobylka A. A. Laboratory equipment at the stage of pharmaceutical development of soft drugs. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(1):29–36. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-29-36.
17. Rudko A. I., Konikov D. L., Sidorov K. O., Ilyinova Yu. G. Transfer bet: development of a regulatory framework for the development of the pharmaceutical industry. *Farmaciya = Pharmacy*. 2020;69(7):5–9. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2020-07-01.
18. Vlasenko Yu. V. Project-oriented approach to finished pharma product development in the context of generic polycomponent drug containing amoxycillin and clavulanic acid. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;(1):30–36. (In Russ.)
19. GOST 29188.2-2014 *Produktsiya parfyumerno-kosmeticheskaya. Metod opredeleniya vodorodnogo pokazatelya pH* [GOST 29188.2-2014 Perfumery and cosmetic production. Method for determination of pH value]. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200136164>. Accessed: 10.06.2021. (In Russ.)
20. GOST 29188.3-91. *Izdeliya kosmeticheskie. Metody opredeleniya stabil'nosti emul'sii* [GOST 29188.3-91 Cosmetics. Methods for determination of emulsion stability]. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200022370>. Accessed: 10.06.2021. (In Russ.)
21. GOST 29188.0-14. *Produktsiya parfyumerno-kosmeticheskaya. Pravila priemki, otbor prob, metody organolepticheskikh ispytaniy* [GOST 29188.0-14 Perfumery and cosmetic productions. Acceptance rules, sampling, organoleptic test methods]. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200136165> Accessed: 10.06.2021. (In Russ.)
22. *Gosudarstvennaya farmakopeya. XIV izdaniya* [The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th edition]. Available at: <https://minzdrav.gov.ru/poleznye-resursy/xiv-izdanie-gosudarstvennoy-farmakopei-rossiyskoy-federatsii>. Accessed: 10.06.2021. (In Russ.)
23. Strus O., Polovko N., Yezerska O. Justification of technological parameters of the cream production with sapropel extract. *Pharmacia*. 2019;66(1):19–25. DOI: 10.3897/pharmacia.66.e35022.
24. Strus O., Polovko N., Plaskonis Y. The investigation of the development of a cream composition with the sapropel extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018;11(7):147–150. DOI: 10.22159/ajpcr.2018.v11i7.23575.
25. Reztsov, E., Mogilyuk V., Ryabko D. *Transfer tekhnologiy v farmatsevticheskoy otrasli* [Technology transfer in the pharmaceutical industry]. *Kontraktnoe proizvodstvo i uslugi*. 2010;2:49–52. (In Russ.)
26. Beregovykh V. V., Spitskiy O. R. Technology Transfer to the Facility for Production of Medicines. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2013;12:49–57. (In Russ.)
27. Technology Transfer. Good Practice Guide. ISPE. 2003. Available at: https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/TransferTechnologyPharmaceuticalManufacturingTRS961Annex7.pdf. Accessed: 10.06.2021.
1. *Analiz rossiyskogo rynka parfyumerii i kosmetiki* [Analysis of the Russian perfumery and cosmetics market]. Available at: http://www.lawlinks.ru/view_obzors.php?id=4768. Accessed: 10.06.2021. (In Russ.)
2. *Proizvodstvo emul'sionnykh kremov* [Production of emulsion creams]. Available at: <http://www.lisyz.ru/tehnologii-proizvodstva/proizvodstvo-emul'sionnykh-kremov.html>. Accessed: 10.06.2021. (In Russ.)
3. Cizauskaite U., Marksa M., Bernatoniene J. The optimization of technological processes, stability and microbiological evaluation of innovative natural ingredients based multiple emulsion. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2018;23:636–645. DOI: 10.1080/10837450.2017.1350981.
4. *TR TS 009/2011 Tekhnicheskiiy reglament Tamozhennogo soyuza "O bezopasnosti parfyumerno-kosmeticheskoy produktsii"* [TR CU 009/2011 Technical Regulations of the Customs Union "On the safety of perfumery and cosmetic products"]. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/902303206>. Accessed: 10.06.2021. (In Russ.)
5. *Kosmeticheskie emul'sii: kakie problemy voznikayut pri razrabotke i proizvodstve* [Cosmetic emulsions: what problems arise during the development and production]. Available at: <https://www.korolevpharm.ru/articles/kosmeticheskie-emulsii-kakie-problemy-voznikayut-pri-razrabotke-i-proizvodstve.html>. Accessed: 10.06.2021. (In Russ.)
6. EMA/CHMP/CVMP/QWP/BWP/70278/2012-Rev 1 Guideline on process validation for finished products – information and data to be provided in regulatory submissions. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-process-validation-finished-products-information-data-be-provided-regulatory-submissions_en.pdf. Accessed: 10.06.2021.
7. Rozhnova S. A., Tsyapkina A. V. Analysis of the system organization of pharmaceutical drug development. *Drug development & registration*. 2017;(3):170–176 (In Russ.)
8. Smekhova I. E., Shigarova L. V., Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Meteleva V. D. Documentation of Pharmaceutical Development. Part 2. Quality System Documents. *Drug development & registration*. 2021; 10(2):147–153. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-147-153.
9. Reamer A., Icerman L. and Youtie J. Technology Transfer and Commercialization: Their Role in Economic Development. *An overview for pharmaceutical industry*. 2010:1–10.
10. Singh Manral M., Prasharl B., Sheikh Ya. Technology Transfer in Pharmaceutical Industry; Facts and Steps Involved. *American Journal of PharmTech Research*. 2012;2(4):74–82.
11. EMA/CHMP/QWP/BWP/245074/2015 Guideline on manufacture of the finished dosage form. 4 July 2017. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-manufacture-finished-dosage-form-revision-1_en.pdf. Accessed: 10.06.2021.
12. John R. M. Technology transfer in pharmaceutical industry. *The Pharma Innovation Journal*. 2017;6(3):235–240.
13. Waghmare Y. S., Mahaparele S. P. The important role of technology transfer in pharmaceutical industry-a review. *World Journal of Pharmaceutics Research*. 2017;6(9):310–329.
14. Mohite P. B., Sangle S. V. Technology transfer in pharmaceutical industry-a review. *International Journal of Advances in Pharmaceutics Research*. 2017;6:1–7.

Разработка гранул целекоксиба для получения капсул и таблеток пролонгированного высвобождения

А. Алходри^{1,2*}, С. Н. Суслина¹

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

² LEM pharma, Медицинская компания, Сирия, г. Хама

* Контактное лицо: Алходри Ахмед. E-mail: Ahmedalkhodri@gmail.com

ORCID: А. Алходри – <https://orcid.org/0000-0001-5215-1079>; С. Н. Суслина – <https://orcid.org/0000-0002-7333-2263>.

Статья поступила: 17.08.2021

Статья принята в печать: 14.01.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Для сокращения кратности приема целекоксиба, как высокоэффективного средства последнего поколения для лечения воспалительных заболеваний опорно-двигательного аппарата, целесообразна разработка лекарственных форм с модифицированным высвобождением, что позволит снизить проявление побочных эффектов и затраты на лечение.

Цель. Разработка составов гранул целекоксиба пролонгированного высвобождения.

Материалы и методы. Эксперименты проведены с материалами и на оборудовании научной лабораторий компании LEM pharma (г. Хама, Сирия). Физико-химические и технологические свойства экспериментальных образцов гранул и таблеток целекоксиба определены по методикам Американской фармакопеи USP 41 NF 36 издания.

Результаты и обсуждение. Осуществлен подбор вспомогательных веществ, в частности целлюлозных полимеров для контроля высвобождения целекоксиба и предложены составы шести модельных образцов гранул. Определены технологические характеристики образцов гранул (индексы Hausner, Carr, плотность распределения и влагосодержание), с помощью теста растворения установлена их пригодность для получения капсул и матричных таблеток пролонгированного высвобождения.

Заключение. Разработаны составы гранул с пролонгированным высвобождением целекоксиба, которые могут быть использованы для получения капсул, а также матричных таблеток в качестве конечной фармацевтической формы.

Ключевые слова: целекоксиб, гранулы, таблетки, капсулы с модифицированным высвобождением

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. Алходри и С. Н. Суслина придумали и разработали эксперименты. А. Алходри синтезировал составов, провел их технологические тесты и исследования методом спектрофотометрии и проводил теоретические расчеты. С. Н. Суслина проверяла качество составов и участвовала в обработке и написании данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Алходри А., Суслина С. Н. Разработка гранул целекоксиба для получения капсул и таблеток пролонгированного высвобождения. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(1):68–73. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-68-73>

Development of Celecoxib Granules for Manufacturing of Prolonged Release Celecoxib Capsules and Tablets

Ahmed Alkhodri^{1,2*}, Svetlana N. Suslina²

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

² LEM pharma, Medical company, Hama, Syria

*Corresponding author: Ahmed Alkhodri. E-mail: Ahmedalkhodri@gmail.com

ORCID: Ahmed Alkhodri – <https://orcid.org/0000-0001-5215-1079>; Svetlana N. Suslina – <https://orcid.org/0000-0002-7333-2263>.

Received: 17.08.2021

Revised: 14.01.2022

Published: 25.02.2022

Abstract

Introduction. To reduce frequency of taking celecoxib dosage forms, as a highly effective drugs of the latest generation for the treatment of inflammatory diseases of the musculoskeletal system, it is advisable to develop pharmaceutical dosage form with modified release, which will reduce side effects and costs treatment.

Aim. The purpose of this study was to develop formulations of prolonged release celecoxib granules.

Materials and methods. Experiments were carried out with materials and equipments of the scientific laboratories of the company LEM pharma (Hama, Syria). The physico-chemical and technological properties of the experimental samples of granules and tablets of celecoxib were determined according to the methods of the American Pharmacopoeia USP 41 NF 36 edition.

Results and discussion. The choice of excipients, in particular, cellulosic polymers to control releasing celecoxib was carried out. The compositions of six model samples of celecoxib granules were proposed. The technological characteristics of the samples of granules (index Hausner, Carr ratio, Particle size distribution and moisture content) have been determined, using a dissolution test, their suitability for obtaining capsules and matrix tablets of prolonged release has been established.

Conclusion. The compositions of granules celecoxib with modified release are developed, which can be used to obtain capsules, as well as matrix tablets as the final pharmaceutical form.

Keywords: celecoxib, granules, tablets, capsules with modified release

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Ahmed Alkhodri and Svetlana Suslina invented and developed experiments. Ahmed Alkhodri synthesized the formulations, carried out their technological tests and studies by spectrophotometry and performed theoretical calculations. Svetlana Suslina checked quality of the formulations and participated in the processing and writing of the data. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Alkhodri A., Suslina S.N. Development of celecoxib granules for manufacturing of prolonged release celecoxib capsules and tablets. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):68–73. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-68-73>

ВВЕДЕНИЕ

Разработка лекарственных форм (ЛФ) с модифицированным высвобождением осуществляется в отношении действующих веществ различных фармакотерапевтических групп (анальгетики, антигистаминные, цитостатики, нейролептики и др.), в том числе и нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) для которых важно обеспечить постоянство терапевтической концентрации в плазме, исключить возможные колебания, сократить частоту введения и общую дозировку, уменьшить затраты на лечение, в том числе за счет снижения побочных токсических явлений [1]. Всемирная организация здравоохранения в 2021 году констатирует заболевания опорно-двигательного аппарата у 1,71 миллиарда человек [2], ревматоидный артрит, например в США, зафиксирован у 63 миллионов человек с прогнозируемым ростом до 78 миллионов в 2040 году [3]. Основу терапии этих заболеваний составляют НПВС [4]. Некоторые препараты Целебрекс®, Мовалис®, Нимулид® обеспечивают быстрое облегчение симптомов, в том числе боли, а другие Вольтарен®, Ибугард®, Кеторол® обеспечивают пролонгированное действие за счет модифицированного высвобождения, что особенно важно для лечения болевого синдрома.

НПВС последнего поколения целекоксиб (4-[5-(4-метилфенил)-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил]бензолсульфонамид), практически нерастворим в воде [5], подавляет синтез простагландинов за счет влияния на циклооксигеназу-2 в терапевтических концентрациях и не затрагивает изофермент циклооксигеназу-1. Однако, в рекомендуемых схемах лечения от 50 до 400 мг 2–5 раз в день могут возникать побочные явления – инфаркт миокарда и увеличение свертываемости крови. На фармацевтическом рынке целекоксиб представлен дозировками 50, 100, 200, 400 мг в форме капсул (Celebrex® – Pfizer Pharmaceuticals, США) и таблеток (Celecoxib® – Nisсан Pharmaceuticals, Индия). В составе твердых желатиновых капсул целекоксиб присутствует в виде гранул [6, 7], полученных методом влажной грануляции, а таблетки целекоксиба получают с предварительной сухой или влажной грануляцией [7]. В существующих ле-

карственных формах высвобождение целекоксиба имеет прямой характер и максимум концентрации в плазме достигается за 2–3 часа. Согласно информации о составе вспомогательных веществ (ВВ) зарегистрированных препаратов содержащих целекоксиб – в ЛФ присутствуют [7]: лактоза моногидрат – наполнитель, лаурил сульфат натрия – солюбилизатор облегчающий всасывание практически нерастворимого в воде действующего вещества целекоксиба, поливинилпирролидон выполняющий роль связующего компонента при грануляции, кроскармеллоза натрия – дезинтегрант, стеарат магния – скользящее, и/или авицел (марка микрокристаллической целлюлозы – МКЦ 102) в таблетках в качестве наполнителя и связующего агента. Согласно данным патента G.D. Searle & Co на составы содержащие целекоксиб 100 и 200 мг, количество ВВ одинаково за исключением лактозы обеспечивающей массу содержимого капсулы 270 мг, высвобождение около 50 % действующего вещества из таблеток происходит за 30–45 минут, а из капсул за 15–30 минут [7].

С помощью различных полимеров можно в значительной степени влиять на скорость и динамику высвобождения лекарств [8]. Производные целлюлозы гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) и этилцеллюлоза (ЭЦ) [9], высоковязкая гидроксипропилцеллюлоза (ГПЦв) и карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) [10, 11] широко используются для контроля высвобождения лекарств, как и различные марки карбопола [12]. Таким образом данные об эффективности целекоксиба в лечении воспалительных заболеваний опорно-двигательного аппарата предполагают создание ЛФ пролонгированного высвобождения с помощью различных полимеров.

Цель. Целью настоящего исследования являлась разработка составов гранул целекоксиба пролонгированного высвобождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты проведены на базе научных лабораторий медицинской компании LEM pharma (г. Хама, Сирия), использовано сертифицирован-

ное оборудование и валидированные в Сирийской Арабской Республике методики с использованием USP 41 NF 36 [13].

Материалы

Действующее вещество – цефекосиб и вспомогательные вещества представлены в таблице 1.

Методы

Фракционный состав образцов гранул определяли по методике «Particle size distribution estimation by analytical sieving 786» USP 41 NF 36, Том 4 [13] с использованием навески материала массой 20,0 г и сит с размерами отверстий: 90, 150, 180, 250, 500, 850 мкм на установке «Electromagnetic sieve shaker EMS-8» (Китай). Насыпную плотность гранул определяли по методике «Bulk Density and Tapped Density «616» USP 41 NF 36, Том 4 [13] на тестере SVM 222 (ERWEKA GmbH, Германия) используя навеску 2,0 г в стеклянном мерном цилиндре вместимостью 25 мл в трехкратной повторности. На основании значений насыпной плотности рассчитывали индексы Hausner и Carr. Индекс Hausner характеризует сыпучесть гра-

нул, которая считается приемлемой при значении менее 1,25. Индекс Carr позволяет оценить прессуемость гранул, которая, в диапазоне 5–15 % будет отличной, при добавлении скользящего вещества [14]. Влагосодержание определяли с помощью MA35 (Sartorius, Япония) при температуре 105 °С, точность определения 0,01 %/мин, анализировали по три образца каждого состава, массой 100 мг.

Грануляцию проводили вручную через сита с диаметром отверстий 600 мкм. Сушку гранул осуществляли в течение 30 минут при 55 °С в сушильном шкафу JSON-050 (JSR, Корея). Модельные таблетки для оценки достижимости предполагаемых характеристик высвобождения цефекосиба получали с предварительной влажной грануляцией с использованием изопропилового спирта (99 %) в качестве увлажнителя на прессе AR 402, 14 mm (ERWEKA GmbH, Германия). Определение технологических характеристик экспериментальных образцов таблеток проводили в соответствии со статьями USP 41 NF 36, Том 4, 5: однородность массы таблеток – «Weight variation of dietary supplements 2091» – весы TE1502S (Sartorius, Япония), прочность на раздавливание – «Breaking force 1217» – TBH 125 (ERWEKA GmbH, Гер-

Таблица 1. Субстанции используемые в работе

Table 1. Substances used in the work

Материал / CAS Material / CAS	Производитель Manufacturer	Страна Country	Торговое наименование Brand name	Серия Batch	Срок годности до Expiration date up to
Цефекосиб / 169590-42-5 Celecoxib / 169590-42-5	Chempfine chemicals	Индия India	Celecoxib®	1606036	11/2022
ГПМЦ-к100м / 9004-65-3 HPMC-к100м / 9004-65-3	SUNHERE	Китай China	Hypromellose® K100M/2208	171025	10/2020
ГПЦ _h / 9004-64-2 HPC _h / 9004-64-2	Nippon Soda	Япония Japan	NISSO HPC-H®	NEK-3231	10/2020
ЭЦ-10cps / 9004-57-3 EC-10cps / 9004-57-3	chemist group	Перу Peru	Ethyl cellulose®	A0421121	08/2025
КМЦ / 9004-32-4 CMC / 9004-32-4	Vega	Китай China	Tylose®	202003130201	05/2023
Карбопол-940 / 9003-01-4 Carbopol-940 / 9003-01-4	Medulla	Испания Spain	Carbomed 940®	0602176	01/2021
МКЦ-102 / 9004-34-6 MCC-102 / 9004-34-6	MINGTAI	Тайвань Taiwan	Comprecel®	C2006019	01/2023
Поливинилпирролидон-к30 / 9003-39-8 Polyvinylpyrrolidone-к30 / 9003-39-8	Farmasino	Китай China	Povidone®	20190621	06/2023
Лаурил сульфат натрия / 151-21-3 Sodium lauryl sulfate / 151-21-3	BASF	Сирия Syria	Kolliphor® SLS Fine	0021395716	11/2024
Лактоза моногидрат / 10039-26-6 Lactose monohydrate / 10039-26-6	DFE pharma	Германия Germany	PHARMATOSE® 200M	104PZFP	07/2022
Стеарат магния / 557-04-0 Magnesium stearate / 557-04-0	GREVEN	Малайзия Malaysia	Palmstar MGST®	C021078	04/2023
Изопропиловый спирт / 67-63-0 Isopropyl alcohol / 67-63-0	Merck	Германия Germany	Isopropyl alcohol®	170231	04/2025

мания), прочность на истирание – «Friability 1216» – TAR 220 (ERWEKA GmbH, Германия) в течение 4 минут в барабане с 12 лопастями при скорости вращения 25 об/мин. Количественное содержание и однородность дозирования цефекоксиба определяли методом спектрофотометрии по лабораторной методике при длине волны 252 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм на приборе UV-1800 [2UV/33] (Shimadzu, Япония) USP 41 NF 36, Том 4 [13]. Высвобождение цефекоксиба (*in vitro*) из таблеток – «Dissolution 711» – оценивали в приборе с лопастной мешалкой Apparatus 2, Paddle Apparatus, DT 128 Light (ERWEKA GmbH, Германия) при 50 об/мин в 900 мл фосфатного буфера (pH 7,4) с 1 % лаурил сульфата натрия при температуре $37 \pm 0,5$ °C.

Результаты и обсуждение. На основе экспериментальных данных по подбору ВВ предложены составы гранул цефекоксиба, таблица 2.

Определены технологические характеристики 6 экспериментальных составов гранул цефекоксиба, представленные в таблицах 3–4.

Влажность гранул находится в допустимом диапазоне 1–4 %, что положительно отразится на стабильности действующего вещества и обеспечит приемлемые механические свойства образцов в течение срока годности [15]. Значения коэффициента Hausner гранул всех составов менее 1,25, что свидетельствует о приемлемой сыпучести для получения таблеток и наполнения капсул. Добавление скользящего вещества позволило значительно улучшить прессуемость и сыпучесть гранул всех составов, так как значения индекса Carr достигло диапазона 5–15.

Таблица 2. Модельные составы гранул цефекоксиба

Table 2. Model formulations of celecoxib granules

Ингредиенты, мг Material, mg	Состав Formulation					
	1	2	3	4	5	6
Цефекоксиб Celecoxib	200	200	200	200	200	200
ГПМЦ-к100м HPMC-к100м	120	90	100	–	–	–
ЭЦ-10cps EC-10cps	–	60	–	–	100	–
КМЦ CMC	–	–	40	–	–	–
Карбопол-940 Carbopol-940	–	–	–	90	–	–
ГПЦ _h HPC _h	–	–	–	–	–	150
Лаурил сульфат натрия Sodium lauryl sulfate	40	40	40	40	40	40
МКЦ-102 MCC-102	130	130	130	130	130	130
Лактоза моногидрат Lactose monohydrate	70	40	50	100	90	5
Поливинилпирролидон-к30 Polyvinylpyrrolidone-к30	20	20	20	20	20	20
Стеарат магния Magnesium stearate	20	20	20	20	20	25
Общая масса Total weight	600	600	600	600	600	600

Как видно из данных таблицы 6, наибольшее значение плотности распределения гранул каждого состава находится в диапазоне 180–250 микрон, таким образом частицы гранул каждого состава имеют пропорциональные размеры для обеспечения од-

Таблица 3. Технологические характеристики модельных составов гранул цефекоксиба

Table 3. Technological characteristics of model formulations of celecoxib granules

Состав Formulation	Влажность, % Moisture, %	Насыпная плотность до утряски, г/см ³ Bulk density, g/cm ³	Насыпная плотность после утряски, г/см ³ Tapped density, g/cm ³	Коэффициент Hausner Hausner index	Индекс Carr, % Carr index, %
		Средние значения $\pm$ SD* Average values $\pm$ SD*			
1**	2,82 $\pm$ 0,12	0,559 $\pm$ 0,0001	0,673 $\pm$ 0,0002	1,203 $\pm$ 0,0003	16,974 $\pm$ 0,025
1***		0,561 $\pm$ 0,0001	0,665 $\pm$ 0,0002	1,185 $\pm$ 0,0007	15,652 $\pm$ 0,051
2	3,17 $\pm$ 0,095	0,564 $\pm$ 0,0003	0,689 $\pm$ 0,0004	1,221 $\pm$ 0,0001	18,161 $\pm$ 0,01
2^A		0,581 $\pm$ 0,0003	0,676 $\pm$ 0,0004	1,163 $\pm$ 0,0001	14,061 $\pm$ 0,0081
3	3,06 $\pm$ 0,11	0,571 $\pm$ 0,0004	0,682 $\pm$ 0,0004	1,194 $\pm$ 0,0002	16,276 $\pm$ 0,014
3^A		0,583 $\pm$ 0,0005	0,661 $\pm$ 0,0006	1,113 $\pm$ 0,0001	11,807 $\pm$ 0,01
4	2,98 $\pm$ 0,081	0,596 $\pm$ 0,0007	0,718 $\pm$ 0,0007	1,204 $\pm$ 0,0001	16,989 $\pm$ 0,0095
4^A		0,612 $\pm$ 0,0007	0,694 $\pm$ 0,0009	1,113 $\pm$ 0,0001	11,815 $\pm$ 0,014
5	3,18 $\pm$ 0,081	0,605 $\pm$ 0,0009	0,753 $\pm$ 0,0014	1,244 $\pm$ 0,0004	19,636 $\pm$ 0,029
5^A		0,621 $\pm$ 0,0009	0,725 $\pm$ 0,0013	1,167 $\pm$ 0,0003	14,347 $\pm$ 0,022
6	2,98 $\pm$ 0,079	0,599 $\pm$ 0,0010	0,741 $\pm$ 0,0016	1,236 $\pm$ 0,0005	19,143 $\pm$ 0,034
6^A		0,618 $\pm$ 0,0011	0,725 $\pm$ 0,0015	1,173 $\pm$ 0,0003	14,771 $\pm$ 0,027

Примечание. * Стандартное отклонение.

** Состав до добавления скользящего вещества.

*** Состав после добавления скользящего вещества.

Note. * Standard deviation.

** Composition before adding lubricant.

*** Composition after addition of lubricant.

Таблица 4. Плотность распределения гранул цефекоксиба всех составов

Table 4. Particle size distribution of celecoxib granules of all formulations

Поле размеров сита, микрон Sieve range size, micron		0–90	90–150	150–180	180–250	250–500	500–850
Средний размер, микрон Median, micron		45	120	165	215	375	675
Диапазон, микрон Range, micron		90	60	30	70	250	350
Процент оставшегося количества, % Percentage Remaining quantity, %	1	6,93	1,91	2,75	33,97	40,06	14,36
	2	3,61	1,13	4,24	30,85	46,42	13,73
	3	2,88	2,09	2,81	35,7	41,56	14,82
	4	1,97	2,56	3,57	34,18	46,98	10,74
	5	1,62	2,57	4,21	30,48	51,49	9,61
	6	1,13	1,65	3,22	26,92	52,13	14,93
Плотность распределения Particle size distribution	1	0,00077	0,00031	0,00091	0,0048	0,0016	0,00041
	2	0,0004	0,00018	0,0014	0,0044	0,0018	0,00039
	3	0,00032	0,00034	0,00093	0,0051	0,0016	0,00042
	4	0,00021	0,00042	0,0011	0,0048	0,0018	0,0003
	5	0,00018	0,00042	0,0014	0,0043	0,002	0,00027
	6	0,00012	0,00027	0,001	0,0038	0,002	0,00042

нородности дозирования действующего вещества и массы лекарственных форм.

Из исследованных и удовлетворяющих технологическим критериям приемлемости гранулятов были получены образцы таблеток и установлены их технологические характеристики: средняя масса $596,65 \pm 10,99$ – $607,8 \pm 7,61$ мг, значения твердости в диапазоне $8,89 \pm 0,57$ – $11,61 \pm 0,34$ кг/см², тест на истираемость показал результат менее 1 %, среднее содержание цефекоксиба в таблетках составило 100,076–103,61 %, что соответствует требованиям статьи «Uniformity of Dosage Units 905» USP 41 NF 36, Том 4 [13]. На рисунке 1 представлены результаты кинетики высвобождения всех составов в качестве таблеток в течение указанного времени в щелочной среде.

Все составы высвобождают цефекоксиб по типу контролируемой эрозии (Case II relaxation release). Составы 1, 2 и 3 показали высвобождение действующего вещества 93,02, 81,47 и 86,56 % соответственно в течение максимально длительного времени. Из состава 6 цефекоксиб высвобождается лишь на 53,56 %

в течение 20 часов, что обусловлено высокой вязкостью ГПЦ и требует дальнейшего изучения для создания системы, обеспечивающей высвобождение в течение 2 суток [16]. Таким образом, составы 1, 2 и 3 перспективны для дальнейшего изучения стабильности и сравнительных испытаний фармакокинетики на животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны составы гранул с модифицированным высвобождением цефекоксиба, которые могут быть использованы для получения капсул, а также матричных таблеток в качестве конечной фармацевтической формы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демина Н.Б. Современные тенденции развития технологии матричных лекарственных форм с модифицированным высвобождением. *Химико-фармацевтический журнал*. 2016;50(7):44–50. DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-7-44-50.

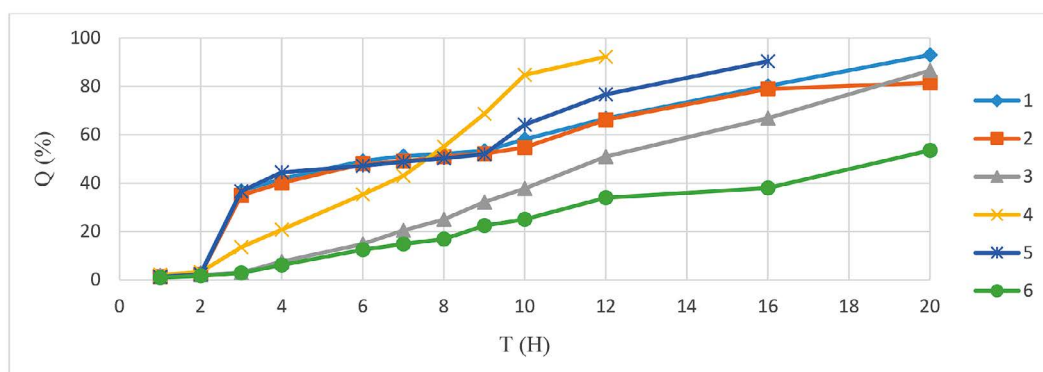


Рисунок 1. Кинетика высвобождения цефекоксиба из модельных составов в качестве таблеток в фосфатной среде – pH 7,4

Figure 1. Kinetics of celecoxib release from model formulations as tablets in a phosphate medium – pH 7.4

2. World health organization (WHO). Musculoskeletal conditions. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/musculoskeletal-conditions>. Accessed: 08.02.2021.
3. Hootman J. M., Helmick C. G., Barbour K. E., Theis K. A., Boring M. A. Updated projected prevalence of self-reported doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation among US adults, 2015–2040. *Arthritis & Rheumatology*. 2016;68(7):1582–1587. DOI: 10.1002/art.39692.
4. Самарцев И. Н., Живолупов С. А., Нажмудинов Р. З. Идентификация нестероидных противовоспалительных средств как основа концепции необходимости соотношения эффективности и рисков. *Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова*. 2019;119(12):124–131. DOI: 10.17116/jnevro2019119121124.
5. Meng F., Ferreira R., Zhang F. Effect of surfactant level on properties of celecoxib amorphous solid dispersions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;49:301–307. DOI: 10.1016/j.jddst.2018.11.026
6. CELECOXIB COMPOSITIONS – Patent Pfizer company in USA No. RE44048. Available at: <http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=793>. Accessed: 04.03.2013.
7. CELECOXIB COMPOSITIONS – European Patent Office – EP 1049467 B1. Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/1f/12/8b/0d155cbe051c78/EP1049467B1.pdf>. Accessed: 09.10.2002.
8. Григорьева М. В. Полимерные системы с контролируемым высвобождением биологически активных соединений. *Биотехнология*. 2011;4(2):9–23.
9. Salve P., Aherrao S., Bali N. Development and Evaluation of Sustained Release Dosage Form using Hydrophilic and Hydrophobic Materials. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2016;9(5):481–489. DOI: 10.5958/0974-360X.2016.00089.5.
10. Qi X., Chen H., Rui Y., Yang F., Ma N., Wu Z. Floating tablets for controlled release of ofloxacin via compression coating of hydroxypropyl cellulose combined with effervescent agent. *International journal of pharmaceutics*. 2015;489(1–2):210–217. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.007.
11. Abdulhameed K. A. A., Salih N. A. Controlled Release of Cefixime using Sodium Carboxymethyl Cellulose Polymer. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2019;12(9):4073–4079. DOI: 10.5958/0974-360X.2019.00701.7.
12. Zhang F., Meng F., Wang Z. Y., Na W. Interpolymer complexation between copovidone and carbopol and its effect on drug release from matrix tablets. *Drug development and industrial pharmacy*. 2017;43(2):190–203. DOI: 10.1080/03639045.2016.1230625.
13. USP 41 – NF 36 (2018) The United States Pharmacopeial Convention, USA. Available at: <https://www.uspnf.com/notices/usp-41-nf-36-online-table-contents-admissions>. Accessed: 04.03.2013.
14. Fonteyne M., Soares S., Vercruysse J., Peeters E., Burggraef A., Vervaeke C., De Beer T. Prediction of quality attributes of continuously produced granules using complementary pat tools. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2012;82(2):429–436. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.07.017.
15. Thapa P., Lee A. R., Choi D. H., Jeong S. H. Effects of moisture content and compression pressure of various deforming granules on the physical properties of tablets. *Powder technology*. 2017;310:92–102. DOI: 10.1016/j.powtec.2017.01.021.
16. Fitriani L., Abdillah R., Ben E. S. Formulation of Metformin HCl Floating Tablet using HPC, HPMC K100M, and the Combinations. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. 2017;4(1):79–82. DOI: 10.29208/jsfk.2017.4.1.201.
2. World health organization (WHO). Musculoskeletal conditions. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/musculoskeletal-conditions>. Accessed: 08.02.2021.
3. Hootman J. M., Helmick C. G., Barbour K. E., Theis K. A., Boring M. A. Updated projected prevalence of self-reported doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation among US adults, 2015–2040. *Arthritis & Rheumatology*. 2016;68(7):1582–1587. DOI: 10.1002/art.39692.
4. Samartsev I. N., Zhivolupov S. A., Nazhmudinov R. Z. Identification of non-steroidal anti-inflammatory drugs as a necessity basis of effectiveness and risk correlation conception. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. CC Korsakova*. 2019;119(12):124–131. (In Russ.) DOI: 10.17116/jnevro2019119121124.
5. Meng F., Ferreira R., Zhang F. Effect of surfactant level on properties of celecoxib amorphous solid dispersions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;49:301–307. DOI: 10.1016/j.jddst.2018.11.026
6. CELECOXIB COMPOSITIONS – Patent Pfizer company in USA No. RE44048. Available at: <http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=793>. Accessed: 04.03.2013.
7. CELECOXIB COMPOSITIONS – European Patent Office – EP 1049467 B1. Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/1f/12/8b/0d155cbe051c78/EP1049467B1.pdf>. Accessed: 09.10.2002.
8. Grigor'yeva M. V. Polymer systems with controlled release of bioactive compounds. *Biotechnologia*. 2011;4(2):9–23. (In Russ.)
9. Salve P., Aherrao S., Bali N. Development and Evaluation of Sustained Release Dosage Form using Hydrophilic and Hydrophobic Materials. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2016;9(5):481–489. DOI: 10.5958/0974-360X.2016.00089.5.
10. Qi X., Chen H., Rui Y., Yang F., Ma N., Wu Z. Floating tablets for controlled release of ofloxacin via compression coating of hydroxypropyl cellulose combined with effervescent agent. *International journal of pharmaceutics*. 2015;489(1–2):210–217. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.007.
11. Abdulhameed K. A. A., Salih N. A. Controlled Release of Cefixime using Sodium Carboxymethyl Cellulose Polymer. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2019;12(9):4073–4079. DOI: 10.5958/0974-360X.2019.00701.7.
12. Zhang F., Meng F., Wang Z. Y., Na W. Interpolymer complexation between copovidone and carbopol and its effect on drug release from matrix tablets. *Drug development and industrial pharmacy*. 2017;43(2):190–203. DOI: 10.1080/03639045.2016.1230625.
13. USP 41 – NF 36 (2018) The United States Pharmacopeial Convention, USA. Available at: <https://www.uspnf.com/notices/usp-41-nf-36-online-table-contents-admissions>. Accessed: 04.03.2013.
14. Fonteyne M., Soares S., Vercruysse J., Peeters E., Burggraef A., Vervaeke C., De Beer T. Prediction of quality attributes of continuously produced granules using complementary pat tools. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2012;82(2):429–436. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.07.017.
15. Thapa P., Lee A. R., Choi D. H., Jeong S. H. Effects of moisture content and compression pressure of various deforming granules on the physical properties of tablets. *Powder technology*. 2017;310:92–102. DOI: 10.1016/j.powtec.2017.01.021.
16. Fitriani L., Abdillah R., Ben E. S. Formulation of Metformin HCl Floating Tablet using HPC, HPMC K100M, and the Combinations. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. 2017;4(1):79–82. DOI: 10.29208/jsfk.2017.4.1.201.

REFERENCES

XVII

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

■ 10 марта 2022 г. | Москва

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ БИЗНЕС В РОССИИ – 2022

Всестороннее обсуждение фармацевтической отрасли.
Самые жаркие темы весны 2022 года, собранные на основе
ваших рекомендаций.
Вы точно найдете тему, интересную лично вам!

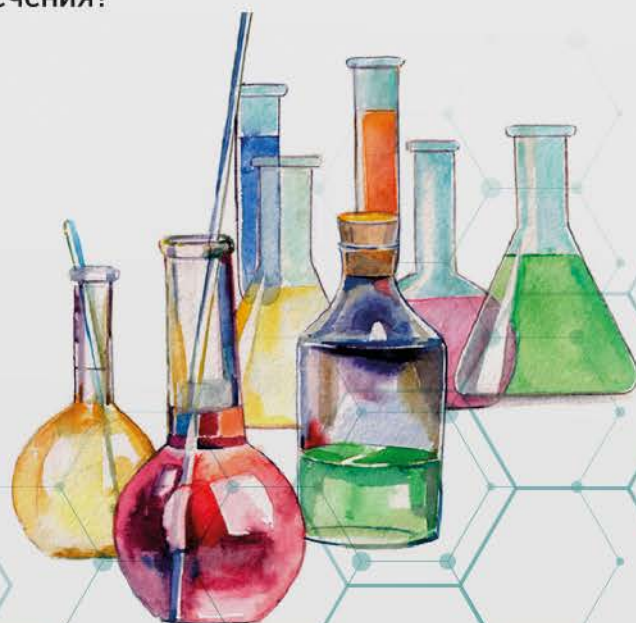
ГЛАВНЫЕ ТЕМЫ:

- ☒ **ИТОГИ ГОДА** — главные вызовы, с которыми столкнулась фарма в ушедшем году
- ☒ **ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРОДОЛЖАЕТСЯ:** контрольные точки, перспективы и прогнозы на 2022 год
- ☒ **ДОСТУПНОСТЬ И НЕПРЕРЫВНОСТЬ.** Реализация стратегии лекарственного обеспечения населения
- ☒ **ЦЕНА И ЦЕННОСТЬ.** Основные проблемы внедрения системы возмещения в России
- ☒ **ФАРМА-2030** — от концепции к реализации
- ☒ **ОТ ОБЩЕГО К ЧАСТНОМУ:** программы поддержки пациентов сегодня
- ☒ **ПОМОЩЬ ДЛЯ БОЛЬНИЦ.** Инфраструктурная благотворительность как один из способов поддержки системы здравоохранения
- ☒ **ТАРГЕТНЫЙ ДОСТУП.** Как обеспечить выход на рынок инновационных лекарственных препаратов и методов лечения?

УСПЕХ КАЖДОГО — ЗАЛОГ ПРОЦВЕТАНИЯ ОТРАСЛИ!

Присоединяйтесь к нам!

Мы уже ждем встречи и работаем
над созданием той самой легендарной
атмосферы!



<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-75-81>
УДК 615.2



Оригинальная статья / Research article

Разработка шипучих гранул с твердой дисперсией фуразолидона

А. О. Елагина^{1*}, А. В. Беляцкая¹, И. И. Краснюк (мл.)¹, И. И. Краснюк¹, О. И. Степанова¹,
А. Н. Воробьев², Т. В. Фатеева³

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

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

³ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

*Контактное лицо: Елагина Анастасия Олеговна. E-mail: a.o.elagina@gmail.com

ORCID: А. О. Елагина – <https://orcid.org/0000-0001-5255-3991>; А. В. Беляцкая – <https://orcid.org/0000-0002-8214-4483>; И. И. Краснюк (мл.) – <https://orcid.org/0000-0001-8557-8829>;
И. И. Краснюк – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>; О. И. Степанова – <https://orcid.org/0000-0002-9885-3727>; А. Н. Воробьев – <https://orcid.org/0000-0002-7182-9911>;
Т. В. Фатеева – <https://orcid.org/0000-0002-8231-0621>.

Статья поступила: 29.06.2021

Статья принята в печать: 25.01.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. В лечении инфекционно-воспалительных заболеваний востребованы действующие вещества (ДВ), характеризующиеся низкой резистентностью микроорганизмов, высокой специфичностью механизма действия и широким спектром антимикробной активности. Фуразолидон (ФЗ) – ДВ отвечающее данным критериям, однако тот факт, что он практически нерастворим в воде существенно ограничивает его применение. Повысить растворимость и скорость растворения ДВ с низкой растворимостью в воде позволяет метод твердых дисперсий (ТД). Предшествующие исследования свидетельствуют об увеличении растворимости и скорости растворения ФЗ в воде из ТД с поливинилпирролидоном-24 000 (ПВП-24 000) в соотношении с ДВ > 6:1 по массе. Вследствие этого, становится возможным введение ТД ФЗ в состав быстрорастворимых шипучих лекарственных форм, например, гранул для получения растворов для наружного применения для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний.

Цель. Разработка состава и технологии получения шипучих гранул на основе твердых дисперсий ФЗ для получения раствора для наружного применения.

Материалы и методы. Субстанция ФЗ, поливинилпирролидон-24 000 ± 2000 (ПВП-24 000 ± 2000), винная кислота, яблочная кислота, натрия карбонат безводный, спирт этиловый 96 %, вода очищенная. Гранулы получали методом гранулирования в псевдоожиженном слое. Анализ полученных гранул проводили по показателям: описание, размер гранул, потеря в массе при высушивании, распадаемость, однородность дозирования согласно ОФС.1.4.1.0004.15 «Гранулы». Также осуществляли качественное и количественное определение ДВ, анализировали pH водного раствора гранул. С целью изучения стабильности и сроков годности образцы гранул были заложены на хранение согласно ОФС.1.10009.15 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств».

Результаты и обсуждение. Разработаны состав и технология шипучих гранул ФЗ для получения раствора для наружного применения. Гранулы получены методом раздельного гранулирования основного (содержащего ТД ДВ) и кислотного компонентов с последующим смешиванием в соотношениях, обеспечивающих получение раствора ФЗ с концентрацией 0,004 % в воде комнатной температуры. Проведена оценка качества, полученных составов, определены срок годности (2 года) и условия хранения (в сухом защищенном от света месте при температуре 25 °С) разработанных составов гранул.

Заключение. В результате технологических и химико-фармацевтических исследований с помощью метода ТД разработана новая лекарственная форма ФЗ – шипучие гранулы, позволяющая получать водный раствор с концентрацией ДВ 0,004 % меньше, чем за 5 минут без нагревания. По результатам работы подана заявка в Роспатент № 2021105988 от 10.03.2021 г. «Быстрорастворимая лекарственная форма фуразолидона и способ ее получения».

Ключевые слова: фуразолидон, твердые дисперсии, поливинилпирролидон (ПВП), шипучие гранулы, растворимость, 2 класс БКС

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. О. Елагина, А. В. Беляцкая и И. И. Краснюк (мл.) планировали и осуществляли проведение экспериментальных исследований, проводили анализ полученных результатов, статистическую обработку результатов, написание текста статьи. А. Н. Воробьев консультировал при проведении гранулирования. И. И. Краснюк осуществил критический пересмотр текста публикации. О. И. Степанова осуществила перевод на английский язык. Т. В. Фатеева участвовала в комплексной оценке качества разработанных составов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов.

Для цитирования: Елагина А. О., Беляцкая А. В., Краснюк (мл.) И. И., Краснюк И. И., Степанова О. И., Воробьев А. Н., Фатеева Т. В. Разработка шипучих гранул с твердой дисперсией фуразолидона. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):75–81. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-75-81>

Development of Effervescent Granules with Solid Dispersion of Furazolidone

Anastasiya O. Elagina^{1*}, Anastasiya V. Beliatskaya¹, Ivan I. Krasnyuk (Jr.)¹, Ivan I. Krasnyuk¹,
Olga I. Stepanova¹, Aleksandr N. Vorob'yov², Tatiana V. Fateeva³

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

³ All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 7/1, Greena str., Moscow, 117216, Russia

*Corresponding author: Anastasiya O. Elagina. E-mail: a.o.elagina@gmail.com

© Елагина А. О., Беляцкая А. В., Краснюк (мл.) И. И., Краснюк И. И., Степанова О. И., Воробьев А. Н., Фатеева Т. В., 2022

© Elagina A. O., Beliatskaya A. V., Krasnyuk (Jr.) I. I., Krasnyuk I. I., Stepanova O. I., Vorob'yov A. N., Fateeva T. V., 2022

ORCID: Anastasiya O. Elagina – <https://orcid.org/0000-0001-5255-3991>; Anastasiya V. Belitskaya – <https://orcid.org/0000-0002-8214-4483>;
Ivan I. Krasnyuk (Jr.) – <https://orcid.org/0000-0001-8557-8829>; Ivan I. Krasnyuk – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>; Olga I. Stepanova – <https://orcid.org/0000-0002-9885-3727>;
Aleksandr N. Vorob'yov – <https://orcid.org/0000-0002-7182-9911>; Tatiana V. Fateeva – <https://orcid.org/0000-0002-8231-0621>.

Received: 29.06.2021

Revised: 25.01.2022

Published: 25.02.2022

Abstract

Introduction. Treatment of infectious and inflammatory diseases demands active substances (AS), characterized by low resistance of microorganisms, high specificity of the mechanism of action and a wide range of antimicrobial activity. Though furazolidone (FZ) – AS meets these criteria, however, practically insolubility in water significantly limits its use. Use of the solid dispersion method (SD) could increase the solubility and dissolution rate of AS with low water solubility. Previous studies indicate an increase in the solubility and dissolution rate of FZ in water from SD with polyvinylpyrrolidone-24 000 (PVP-24 000) in a ratio with AS > 6:1 by weight. As a result, it becomes possible to introduce SD FZ into the composition of rapidly dissolving effervescent dosage forms, for example, granules for obtaining solutions for external use for the treatment of infectious and inflammatory diseases.

Aim. Development of the composition and technology for producing effervescent granules based on solid dispersions of FZ for obtaining a solution for external use.

Materials and methods. FZ substance, polyvinylpyrrolidone-24 000 ± 2000 (PVP-24 000 ± 2000), tartaric acid, malic acid, sodium carbonate anhydrous, ethyl alcohol 96 %, purified water. We provided the granules through fluidized bed granulation. The analysis of the obtained granules included the following parameters: description, granule size, loss in mass on drying, disintegration, uniformity of dosage according to GPM 1.4.1.0004.15 "Granules". Then followed a qualitative and quantitative determination of AS and analysis of the pH of the aqueous solution of the granules. To study the stability and shelf life of the samples of granules, we laid them to the storage in accordance with GPM 1.10009.15 "Stability and shelf life of drugs".

Results and discussion. We developed the composition and technology of FZ effervescent granules for obtaining a solution for external use. Granules are obtained by separate granulation of the main (containing a SD AS) and acid components, followed by mixing in ratios that provide a solution of FZ with a concentration of 0.004 % in water at room temperature. Later we assessed the quality of the obtained compositions and determined, the shelf life (2 years) and storage conditions (in a dry, dark place at a temperature of 25 °C) of the developed compositions of granules.

Conclusion. As a result of technological and chemical-pharmaceutical research using the SD method, we developed a new FZ dosage form – effervescent granules, which makes it possible to obtain an aqueous solution with a concentration of FZ 0.004 % in less than 5 minutes without heating. Based on the results of the work, an application was filed with Rospatent No. 2021105988 dated 10.03.2021, "Fast-dissolving dosage form of furazolidone and a method for its production".

Keywords: furazolidone, solid dispersions, polyvinylpyrrolidone (PVP), effervescent granules, solubility, BCS class 2

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Anastasiya O. Elagina, Anastasiya V. Belitskaya and Ivan I. Krasnyuk (Jr.) planned and carried out experimental studies, analyzed the results obtained, statistically processed the results, and wrote the text of the article. Aleksandr N. Vorob'yov advised on granulation. Ivan I. Krasnyuk carried out a critical revision of the publication text. Olga I. Stepanova translated into English. Tatiana V. Fateeva took part in a comprehensive assessment of the quality of the developed formulations. All authors took part in the discussion of the results.

For citation: Elagina A. O., Belitskaya A. V., Krasnyuk (Jr.) I. I., Krasnyuk I. I., Stepanova O. I., Vorob'yov A. N., Fateeva T. V. Development of effervescent granules with solid dispersion of furazolidone. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):75–81. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-75-81>

ВВЕДЕНИЕ

В лечении инфекционно-воспалительных заболеваний, востребованы действующие вещества (ДВ) характеризующиеся низкой резистентностью микроорганизмов и широким спектром антимикробной активности. ДВ, удовлетворяющие этим требованиям, часто относятся ко 2-му классу биофармацевтической системы классификации (БКС, BCS) [1]. Одним из таких ДВ, вследствие специфичности механизма действия, является фуразолидон (ФЗ). Положительные особенности ФЗ – медленное развитие устойчивости микроорганизмов к нему, эффективность в отношении ряда бактерий, резистентных к антибиотикам и сульфаниламидам [2].

ФЗ рекомендован для профилактики и лечения заболеваний мочеполовой системы, таких как цистит, уретрит и вагинит, эффективен при кандидозе, трихо-

монадных инфекциях, лямблиозе, шигеллиозе (клинические рекомендации МЗ от 23.01.19 2019 года (МКБ 10: N30.0/N30.1/N30.2/N30.8). Применяется местно при комплексном лечении инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта и носоглотки, кожи. Традиционно применяется наружно в виде растворов с концентрацией 0,004 % (1:25 000) при комплексном лечении небольших ран, склонных к инфицированию [2, 3].

ФЗ – производное нитрофурана, желтый или желтый с зеленоватым оттенком мелкокристаллический порошок без запаха, не гигроскопичен, практически не растворим в воде и спирте этиловом 96 % [4]. На фармацевтическом рынке РФ ФЗ представлен таблетками с дозировкой 50 мг. В связи с тем, что ФЗ практически не растворим в воде, изготовление раствора для местного и наружного применения [терапевтическая концентрация 1:25 000 (0,004 %)] из данных та-

блеток является длительным и трудоёмким процессом, сопряженным с предварительным измельчением, кипячением и дальнейшим охлаждением раствора [2].

Повышение растворимости ДВ позволит создать быстрорастворимые шипучие лекарственные формы (ЛФ) ФЗ, расширит возможности и удобство его применения.

Одним из методов, позволяющим повысить растворимость и скорость растворения ДВ, является метод твердых дисперсий (ТД). ТД – это би- или многокомпонентные системы, состоящие из ДВ и носителя, представляющие собой высоко диспергированную твердую фазу ДВ или молекулярно-дисперсные твердые растворы с частичным образованием комплексов переменного состава с материалом носителя [3]. Технология ТД используется для увеличения высвобождения ДВ из ЛФ, повышения фармакологической активности и биодоступности за счет увеличения растворимости и скорости высвобождения ДВ [5–8].

В ходе предшествующих исследований по повышению растворимости и скорости растворения ФЗ методом ТД в качестве оптимального носителя был выбран поливинилпирролидон-24 000 (ПВП-24 000) в соотношении >6:1 по массе к ДВ. При этом растворимость ТД ФЗ возрастает в 1,56 раза. Скорость растворения ТД ФЗ возрастает в 3–1,9 раза в интервале времени от 5 до 15 мин от начала растворения, соответственно [9].

Вследствие этого становится возможным введение ТД ФЗ в состав шипучих ЛФ, например, гранул для получения растворов для наружного применения для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний кожных покровов, мочеполовой системы, рта и носоглотки [10].

Цель. Разработка состава и технологии получения шипучих гранул на основе твердой дисперсии фуразолидона для получения раствора для наружного применения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реактивы: субстанция фуразолидона (ОАО «Ирбитский химфармзавод», Россия), ПВП-24 000 ± 2000 (Sigma-Aldrich, США), винная кислота (ООО «АльбаХим», Россия), яблочная кислота (ООО «АльбаХим», Россия), карбонат натрия безводный х.ч. (Купавнареактив, Россия), спирт этиловый 96 % (ООО «Константа-Фарм М», Россия), вода очищенная.

Приборы и аппаратура: весы лабораторные MWP-150 (CAS, Южная Корея), весы аналитические GH-202 (AND, Япония), установка для грануляции «Mucrolab» (BOSCH, Германия), спектрофотометр UNICO, модель 2800 (UNICO, США), магнитная мешалка MSH basic (IKA, Германия), иономер лабораторный И-160МИ (ООО «Измерительная техника», Россия), влагомер MA35M (Sartorius Weighing Technology GmbH, Германия), просеивающая машина AS 200 control (Retsch GmbH, Германия).

Методики

Получение основного гранулята с ТД ФЗ. Для получения гранулирующей жидкости (ГЖ) растворяли ФЗ и ПВП-24000 в спирте этиловом 96 % при нагревании на водяной бане (95 ± 5 °C). В продуктовый контейнер установки для грануляции «Mucrolab» загружали порошок карбоната натрия безводного, предварительно измельченного и последовательно просеянного через сита с диаметром отверстий 250 мкм и 45 мкм с использованием просеивающей машины AS 200 control. Фракции частиц более 250 мкм и менее 45 мкм не гранулировали. Проводили гранулирование в псевдоожиженном слое, параметры гранулирования стандартные.

Получение кислотных гранулятов. Для получения ГЖ растворяли ПВП-24000 в спирте этиловом 96 % при нагревании на водяной бане (95 ± 5 °C). В продуктовый контейнер загружали порошок винной или яблочной кислот, обработанный аналогично порошку карбоната натрия безводного.

Получение гранул составов 1 и 2. Для получения гранул составов 1 и 2 основной и кислотный гранулят смешивали в соотношениях – 1,0:1,3 и 1,0:1,1, соответственно таблице 1, вводили скользящее вспомогательное вещество (ВВ) – натрия бензоат в количестве 2 % от опудриваемой массы. Данное скользящее ВВ было выбрано вследствие растворимости в воде, обеспечивающей образование прозрачных растворов при растворении разработанных составов. Полученные гранулы фасовали в однодозовые герметичные упаковки – саше.

Качественные испытания. Согласно ОФС.1.4.1.0004.18 «Гранулы» проводили исследование полученных гранул по испытаниям: описание, размер гранул, потеря в массе при высушивании, распадаемость, однородность дозирования. Также проводили качественное и количественное определение ДВ, измеряли pH водных растворов гранул. Определяли срок годности и условия хранения. Качественная реакция на ФЗ – бурое окрашивание при взаимодействии с натрия гидроксидом [4]. Одну дозу гранул растворяли в 100 мл воды очищенной, отбирали пробу объемом 10 мл и смешивали с 10 мл смеси вода – 30 % раствор гидроксида натрия (3:2) и нагревали, наблюдали бурое окрашивание.

Сравнительный анализ высвобождения ФЗ из разработанных шипучих гранул и заводских таблетированных ЛФ. В коническую колбу с образцом (разработанные шипучие гранулы или таблетки промышленного производства ФЗ), прибавляли 200 мл воды очищенной (20 ± 1 °C). Для детального изучения динамики высвобождения ФЗ из твердых ЛФ через 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 мин от начала растворения отбирали по 5 мл раствора и восполняли отобранный объем водой очищенной. Растворы фильтровали через шприцевые насадки Minisart с диаметром пор

Таблица 1. Составы разработанных гранул с твердой дисперсией фуразолидона

Table 1. Compositions of the developed granules with solid dispersion of furazolidone

Ингредиент Ingredient	Состав № 1 Speciation №1			Состав № 2 Speciation №2		
	на 1 дозу гранул for 1 dose of granules		на 100,0 by 100.0	на 1 дозу гранул for 1 dose of granules		на 100,0 by 100.0
	г g	%	г g	г g	%	г g
Фуразолидон Furazolidone	0,004	0,105	0,105	0,004	0,114	0,114
ПВП-24000 (в основном и кислотном грануляте) PVP-24000 (in based and acidic granulate)	0,061/0,006	1,605/0,158	1,605/0,158	0,061/0,005	1,743/0,143	1,743/0,143
Натрия карбонат безводный Sodium carbonate anhydrous	1,558	41,000	41,000	1,574	44,971	44,971
Винная кислота Wine acid	2,095	55,132	55,132	–	–	–
Яблочная кислота Apple acid	–	–	–	1,786	51,029	51,029
Натрия бензоат Sodium benzoate	0,076	2,000	2,000	0,070	2,000	2,000
Итого масса: Total weight:	3,800	100,000	100,000	3,500	100,000	100,000

0,45 мкм, фильтрующий материал – нейлон. При необходимости пробу разбавляли водой очищенной. Проводили количественное определение ФЗ в исследуемых образцах.

Использование не фармакопейной методики, адаптированной под сравнительный анализ высвобождения ФЗ (в одинаковых условиях) из быстрорастворимой ЛФ гранулы (растворение не более 5 мин), так и из обычных таблеток ФЗ (высвобождение через 45 мин), обосновано стремлением наглядно продемонстрировать быстроту и удобство приготовления раствора из разработанных шипучих гранул по сравнению с имеющимися на фармацевтическом рынке таблетками ФЗ, из которых в аналогичных условиях невозможно приготовить раствор ДВ с терапевтической концентрацией 0,004 % даже через 60 мин от начала растворения.

Изучение растворения ФЗ. Коническую колбу с образцом (разработанные шипучие гранулы ФЗ, таблетки промышленного производства ФЗ) помещали на магнитную мешалку (200 об/мин) с термостатированием ($20 \pm 1^\circ\text{C}$), прибавляли 150 мл воды очищенной. Через 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 мин отбирали по 5 мл раствора и восполняли отобранный объем водой очищенной. Растворы фильтровали через шприцевые насадки Minisart с диаметром пор 0,45 мкм, фильтрующий материал – нейлон. При необходимости пробу разбавляли водой очищенной. Проводили количественное определение ФЗ в исследуемых образцах.

Использование методики обосновано тем, что разработанные шипучие гранулы предназначены для получения раствора для наружного применения путем растворения в воде комнатной температуры. Сравнение с динамикой растворения промышленно произведенных таблеток ФЗ наглядно демонстрирует быстроту и удобство приготовления раствора из разработанных шипучих гранул.

Количественное определение ФЗ. Количественное определение ФЗ в растворах исследуемых образцов (гранулы, таблетки ФЗ 50 мг (Авексима) проводили методом УФ-спектрофотометрии. В мерную колбу на 500 мл помещали одну дозу гранул, растворяли в 100 мл воды очищенной, раствор перемешивали на магнитной мешалке в течение 5 мин (скорость 200 об/мин). Доводили объем полученного раствора до метки водой очищенной, перемешивали. Отобранные пробы фильтровали через шприцевые насадки Minisart с диаметром пор 0,45 мкм, фильтрующий материал – нейлон.

Помещали в кювету полученный раствор и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 366 ± 2 нм. Предварительно установлено отсутствие влияния ВВ на максимумы спектра поглощения ФЗ и его интенсивность. Раствор сравнения – вода очищенная. Далее рассчитывали концентрацию ФЗ, используя калибровочный график.

Определение срока хранения гранул. С целью изучения стабильности и сроков годности образцы гранул были заложены на хранение (ОФС.1.10009.15 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств»). Образцы гранул хранили в однодозовой

упаковке (саше). Долгосрочные испытания проводили на 3 сериях каждого состава при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и относительной влажности $60 \pm 5\%$; ускоренные испытания проводили на 3 сериях каждого состава при температуре $40 \pm 2^\circ\text{C}$ и относительной влажности $75 \pm 5\%$. В день изготовления и в процессе хранения [через каждые 3 мес. в течение первого года хранения и через каждые 6 мес. в течение 2 года при долгосрочных испытаниях; в день изготовления и в процессе хранения (3 и 6 мес.) при ускоренных испытаниях] образцы гранул анализировали по следующим показателям: описание, подлинность, количественное содержание, потеря в массе при высушивании, распадаемость, pH.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанные составы шипучих гранул, содержащих в качестве ДВ ТД ФЗ представлены в таблице 1. В ходе скрининга ВВ были изучены различные комбинации органических кислот (винной, яблочной, лимонной) с карбонатом и гидрокарбонатом натрия. Основными критериями скрининга служили показатели распадаемости и pH. Соотношение кислотного и основного гранулятов определялось экспериментально [11–13]. Для разработанных составов были выбраны следующие соотношения основного и кислотного компонентов (по массе): натрия карбонат безводный:кислота винная – 1,000:1,345 (состав № 1), натрия карбонат безводный:кислота яблочная – 1,000:1,135 (состав № 2). Данные составы позволяют получить раствор ФЗ для наружного применения с минимальным значением показателя распадаемости и с комфортным для наружного применения значением pH $\approx 6,0 \pm 0,5$.

Особенность разработанной технологии получения гранул заключается в отсутствии отдельного технологического этапа получения самой ТД, требующей стандартизации и оценки качества промежуточного продукта. В предложенной технологии стадии получения ТД, смешивания компонентов, грануляции и сушки проводятся в одном аппарате, что способствует созданию непрерывного производства с высокой производительностью [14–16].

Разработанные составы шипучих гранул позволяют значительно сократить время растворения ФЗ в воде, исключая процесс длительного нагревания и позволяя получать раствор ДВ в воде комнатной температуры менее чем за 5 мин, значительно упрощая способ его применения. Полученные составы гранул могут быть использованы в дальнейшем для изготовления шипучих таблеток ФЗ.

С целью наглядной демонстрации преимуществ разработанных шипучих гранул ФЗ над представленными на российском фармацевтическом рынке таблетками ФЗ с дозировкой 50 мг (Авексима) проведено сравнительное исследование высвобождения ДВ. Рисунок 1 демонстрирует преимущество разработанных шипучих гранул (составы 1 и 2), содержащих ТД ФЗ – быстроту приготовления раствора из них по сравнению с растворением промышленно произведенных таблеток ФЗ. При помещении таблетки ФЗ с дозировкой 50 мг в 100 мл воды при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$ насыщение раствора проходило крайне медленно, не превышая по истечении 1 ч концентрации $2,87 \times 10^{-2}$ г/л, а гранулы составов 1 и 2 с ТД ФЗ в тех же условиях быстро насыщали раствор до терапевтической концентрации $4,00 \times 10^{-2}$ г/л менее чем за

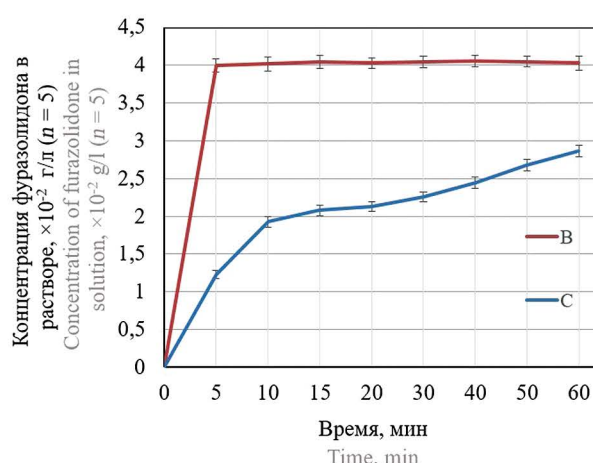
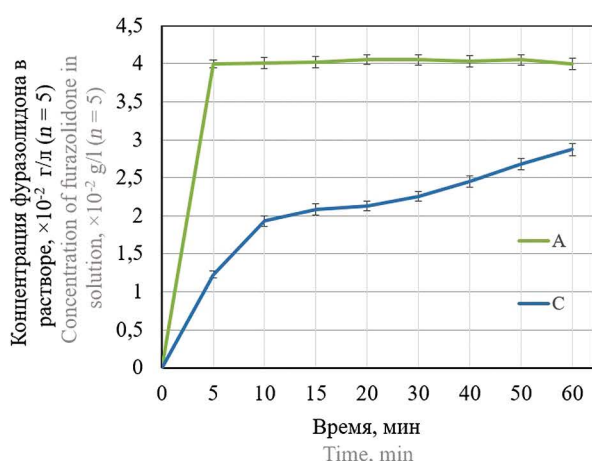


Рисунок 1. Высвобождение фуразолидона:

A – разработанные шипучие гранулы – состав 1; **B** – разработанные шипучие гранулы – состав 2; **C** – таблетки Фуразолидона 50 мг (Авексима)

Figure 1. Release of furazolidone:

A – developed effervescent granules – composition 1; **B** – developed effervescent granules – composition 2; **C** – Furazolidone tablets 50 mg (Avexim)

5 мин, образуя растворы с концентрацией ДВ 0,004 %, готовые для наружного применения.

Результаты проведенной оценки качества разработанных гранул приведены в таблице 2. Разработанные составы гранул соответствуют предъявленным ГФ XIV требованиям.

С целью определения стабильности и сроков годности серии образцов гранул составов № 1 и 2 были заложены на долгосрочные и ускоренные испытания. Внешний вид, потеря в массе при высушивании, распадаемость гранул и pH водных растворов изменяются незначительно. Образцы гранул ФЗ характеризуются постоянством качественного и количественного содержания ДВ в течение всего эксперимента. Путем

долгосрочных и ускоренных испытаний определен срок годности (2 года) и условия хранения (в сухом защищенном от света месте при температуре 15–25 °С); первичная упаковка – саше, обеспечивают стабильное хранение препарата на протяжении всего срока годности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью метода твердых дисперсий разработана новая лекарственная форма фуразолидона – шипучие гранулы, позволяющая получать водный раствор с концентрацией ДВ 0,004 % в воде комнатной температуры менее чем за 5 мин. Проведена оценка качества полученных составов, определе-

Таблица 2. Показатели качества шипучих гранул с твердыми дисперсиями фуразолидона

Table 2. Quality indicators of effervescent granules with solid dispersions of furazolidone

Показатели Indicators	Методы Methods	Результаты Results	
		Состав № 1 Speciation № 1	Состав № 2 Speciation № 2
Описание Characters	Визуальный Visual	Смесь округлых гранул без оболочки светло-желтого цвета (основной гранулят) и белого цвета (кислотный гранулят) A mixture of rounded granules without a shell, light yellow (basic granulate) and white (acidic granulate)	
Подлинность Identification	УФ-спектрофотометрия, качественная реакция UV spectrophotometry, identification test	УФ-спектры водного раствора от 190 до 500 нм должны соответствовать по характеристическим пикам стандарту ФЗ. Бурое окрашивание при взаимодействии с раствором натрия гидроксида UV spectra of an aqueous solution from 190 to 500 nm should correspond to the characteristic peaks of the furazolidone standard. Brown staining when interacting with sodium hydroxide solution	
Количественное определение, $C_{cp} \pm \Delta C, n = 5$ (г/л) Potency assay, $C_{avg} \pm \Delta C, n = 5$ (g/l)	УФ-спектрофотометрия UV spectrophotometry	0,040 ± 0,001	0,040 ± 0,001
pH водного раствора, $n = 5$ (ед.) pH of aqueous solution, $n = 5$ (unit)	ГФ XIV SPH XIV	6,0 ± 0,5	6,0 ± 0,5
Размер гранул (мм) Granule size (mm)	ГФ XIV SPH XIV	от 0,2 до 1,0 from 0,2 to 1,0	от 0,2 до 1,0 from 0,2 to 1,0
Потеря в массе при высушивании, $n = 5$ (%) Loss of drying, $n = 5$ (%)	ГФ XIV SPH XIV	1,31 ± 0,26	1,11 ± 0,15
Распадаемость, $t_{cp} \pm \Delta t, n = 5$ (сек.) Disintegration $t_{avg} \pm \Delta t, n = 5$ (sec.)	ГФ XIV SPH XIV	145 ± 6	123 ± 6
Однородность дозирования (%) Dose uniformity (%)	ГФ XIV SPH XIV	99,8 AV (4,32) < L1 (15,0)	100,0 AV (6,21) < L1 (15,0)
Упаковка Packaging	В герметичные пакетики типа Stickpack – саше, 3,8 г (состав № 1) и 3,5 г (состав № 2), соответственно, 10 саше вместе с инструкцией в картонной пачке In sealed Stickpack-type sachets – sachets, 3.8 g (composition No. 1) and 3.5 g (composition No. 2), respectively, 10 sachets together with instructions in a cardboard box		
Маркировка Marking	В соответствии с НД In accordance with regulatory documents		
Хранение Storage	В защищенном от света месте с температурой воздуха не выше 25 °С In a dark place with an air temperature not exceeding 25 °C		
Срок годности Shelf life	2 года 2 years		

ны срок годности (2 года) и условия хранения (в сухом защищенном от света месте при температуре 25 °С) разработанных составов гранул.

По результатам работы подана заявка в Роспатент № 2021105988 от 10.03.2021 г. «Быстрорастворимая лекарственная форма фуразолидона и способ ее получения».

ЛИТЕРАТУРА

- Charalabidis A., Sfouni M., Bergström C., Macheras P. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond guidelines. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;566:264–281. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.05.041.
- Машковский М. Д. Лекарственные средства. 16-е изд. М.: Новая Волна; 2016. 1216 с.
- Беляцкая А. В., Кашликова И. М., Елагина А. О., Краснюк (мл.) И. И., Краснюк И. И., Степанова О. И. Нитрофураны для наружного применения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):38–47. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-38-47.
- Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 3. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2018. 5004 с.
- Singh N., Sarangi M. K. Solid Dispersion – a Novel Approach for Enhancement of Bioavailability of Poorly Soluble Drugs in Oral Drug Delivery System. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;3(2):1–8. DOI: 10.19080/GJPPS.2017.03.555608.
- Habiba N. A. Solid dispersion: a substitute approach for poorly water soluble drug. Dhaka: BRAC University; 2015; 53 p.
- Huang S. Mao C., Williams R. O., Yang C. Solubility Advantage (and Disadvantage) of Pharmaceutical Amorphous Solid Dispersions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105(12):1–13. DOI: 10.1016/j.xphs.2016.08.017.
- Younis M. A. Solid Dispersion Technology, a Contemporary Overview on a well Established Technique. *Universal Journal of Pharmaceutical Research*. 2017;2(3):15–19. DOI: 10.22270/ujpr.v2i3.RW1.
- Beliatskaya A. V., Krasnyuk I. I., Elagina A. O., Kashlikova I. M., Stepanova O. I., Kuzmenko A. N., Iskenderova S. G., Kannieva D. R., Vorob'yov A. N. Study of the solubility of furazolidone from solid dispersions with polyvinylpyrrolidone. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2020;75(1):43–46. DOI: 10.3103/S0027131420010046.
- David J. Backstedt D. W., O'Keefe K. J., Salehpour K., Gerkin R. Tu1203 Effervescent Granules Are a Safe, Effective, and Cost-Saving Initial Strategy in Acute Esophageal Food Impaction. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2017;85(5):AB574. DOI: 10.1016/J. GIE.2017.03.1340.
- Krasnyuk I. I. (мл.), Беляцкая А. В., Краснюк И. И. Степанова О. И., Овсянникова Л. В., Грих В. В., Алленова Т. М., Одинцова Е. Б. Перспективы применения твердых дисперсий с поливинилпирролидоном в медицине и фармации. *Фармация*. 2016;65(6):7–11.
- Teodorescu M., Bercea M., Morariu S. Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: perspectives and challenges. *Biotechnology Advances*. 2019;37:109–131. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.008.
- Osman Y. B., Liavitskaya T., Vyazovkin S. Polyvinylpyrrolidone affects thermal stability of drugs in solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;551(1–2):111–120. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.020.
- Hou H. H. Rajesh A., Pandya K. M. Impact of Method of Preparation of Amorphous Solid Dispersions on Mechanical Properties: Comparison of Coprecipitation and Spray Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;108(2):870–879. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.09.008.
- Jassim Z. E., Rajab N. A., Mohammed N. H. Study the effect of wet granulation and fusion methods on preparation, characterization, and release of lornoxicam sachet effervescent granules. *Drug Invention Today*. 2018;10(9):1612–1616.
- Singh A. Van den Mooter G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;100:27–50. DOI: 10.1016/j.addr.2015.12.010.

REFERENCES

- Charalabidis A., Sfouni M., Bergström C., Macheras P. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond guidelines. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;566:264–281. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.05.041.
- Mashkovskiy M. D. *Lekarstvennyye sredstva* [Medicines] 16th ed. Moscow: Novaya Volna; 2016. 1216 p. (In Russ.)
- Beliatskaya A. V., Kashlikova I. M., Elagina A. O., Krasnyuk (jr.) I. I., Krasnyuk I. I., Stepanova O. I. Nitrofurans for External Use. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(2):38–47. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-38-47.
- Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIV ed. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii; 2018. 5004 p. (In Russ.)
- Singh N., Sarangi M. K. Solid Dispersion – a Novel Approach for Enhancement of Bioavailability of Poorly Soluble Drugs in Oral Drug Delivery System. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;3(2):1–8. DOI: 10.19080/GJPPS.2017.03.555608.
- Habiba N. A. Solid dispersion: a substitute approach for poorly water soluble drug. Dhaka: BRAC University; 2015; 53 p.
- Huang S. Mao C., Williams R. O., Yang C. Solubility Advantage (and Disadvantage) of Pharmaceutical Amorphous Solid Dispersions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105(12):1–13. DOI: 10.1016/j.xphs.2016.08.017.
- Younis M. A. Solid Dispersion Technology, a Contemporary Overview on a well Established Technique. *Universal Journal of Pharmaceutical Research*. 2017;2(3):15–19. DOI: 10.22270/ujpr.v2i3.RW1.
- Beliatskaya A. V., Krasnyuk I. I., Elagina A. O., Kashlikova I. M., Stepanova O. I., Kuzmenko A. N., Iskenderova S. G., Kannieva D. R., Vorob'yov A. N. Study of the solubility of furazolidone from solid dispersions with polyvinylpyrrolidone. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2020;75(1):43–46. DOI: 10.3103/S0027131420010046.
- David J. Backstedt D. W., O'Keefe K. J., Salehpour K., Gerkin R. Tu1203 Effervescent Granules Are a Safe, Effective, and Cost-Saving Initial Strategy in Acute Esophageal Food Impaction. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2017;85(5):AB574. DOI: 10.1016/J. GIE.2017.03.1340.
- Krasnyuk I. I. (Jr.), Belyatskaya A. V., Krasnyuk I. I., Stepanova O. I., Ovsyannikova L. V., Grikh V. V., Allenova T. M., Odintsova E. B. Prospects for using solid polyvinylpyrrolidone dispersions in medicine and pharmacy. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2016;65(6):7–11. (In Russ.)
- Teodorescu M., Bercea M., Morariu S. Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: perspectives and challenges. *Biotechnology Advances*. 2019;37:109–131. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.008.
- Osman Y. B., Liavitskaya T., Vyazovkin S. Polyvinylpyrrolidone affects thermal stability of drugs in solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;551(1–2):111–120. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.020.
- Hou H. H. Rajesh A., Pandya K. M. Impact of Method of Preparation of Amorphous Solid Dispersions on Mechanical Properties: Comparison of Coprecipitation and Spray Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;108(2):870–879. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.09.008.
- Jassim Z. E., Rajab N. A., Mohammed N. H. Study the effect of wet granulation and fusion methods on preparation, characterization, and release of lornoxicam sachet effervescent granules. *Drug Invention Today*. 2018;10(9):1612–1616.
- Singh A. Van den Mooter G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;100:27–50. DOI: 10.1016/j.addr.2015.12.010.

Определение оптимальных технологических условий процесса получения липосомальной лекарственной формы цифетрилина

М. В. Дмитриева^{1*}, О. Л. Орлова¹, А. В. Ланцова¹, И. И. Краснюк²

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

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

*Корреспондент: Дмитриева Мария Вячеславовна. E-mail: dmitrieva.m@ronc.ru

ORCID: М. В. Дмитриева – <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>; О. Л. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>; А. В. Ланцова – <https://orcid.org/0000-0002-0650-2023>; И. И. Краснюк – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Статья поступила: 07.09.2021

Статья принята в печать: 04.02.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. В лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России разработана композиция инъекционной липосомальной лекарственной формы на основе соевого фосфатидилхолина гидрофобного аналога гипоталамического гормона соматостатина – цифетрилина, предназначенного для терапии нейроэндокринных опухолей.

Цель. Определение оптимальных технологических условий процесса получения липосомальной лекарственной формы цифетрилина.

Материалы и методы. В работе использована субстанция цифетрилина, синтезированная в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России (Россия); соевый фосфатидилхолин S PC и полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтанолламин, произведенные компанией Lipoid GmbH (Германия); холестерин $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Япония). Для приготовления фосфолипидных везикул, загруженных цифетрилином и «пустых», применяли метод гидратации липидной пленки с последующей экструзией или гомогенизацией дисперсии многослойных липосом. Полученные образцы липосомальной дисперсии оценивали по показателям качества – эффективность включения цифетрилина в везикулы, их средний размер и поверхностный заряд (дзета-потенциал), вязкость дисперсии. Для оценки данных характеристик применены методы спектрофотометрии, лазерной спектроскопии рассеяния, определения электрофоретической подвижности частиц и вискозиметрии.

Результаты и обсуждение. Установлено, что наиболее подходящим органическим растворителем для получения раствора цифетрилина и липидных компонентов лекарственной формы является хлороформ. Продолжительность периода высушивания липидной пленки под вакуумом для удаления остаточного растворителя определяется соотношением объема используемой отгонной колбы и массой ее загрузки. При этом смыл липидной пленки водой для инъекций следует проводить в условиях пониженного давления и комнатной температуры. Для получения дисперсии однослойных липосом цифетрилина требуемого размера с сохранением высокого уровня включения лекарственного вещества в везикулы выбран метод экструзии с использованием нейлоновых и поликарбонатных мембран с диаметром пор фильтра 0,22 и 0,2 мкм, соответственно.

Заключение. Определены оптимальные технологические условия процесса получения липосомальной лекарственной формы в виде дисперсии гидрофобного аналога гипоталамического гормона соматостатина – цифетрилина.

Ключевые слова: липосомы, лекарственная форма, дисперсия, технологические факторы, цифетрилин, соевый фосфатидилхолин

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. М. В. Дмитриева – дизайн исследования, получение и анализ данных, написание текста статьи. О. Л. Орлова – дизайн исследования, анализ данных. А. В. Ланцова – получение и анализ данных, обзор публикаций. И. И. Краснюк – дизайн исследования, проверка окончательной версии статьи.

Финансирование. Исследование проведено в рамках государственного задания № АААА-А20-120031190026-9 «Создание инновационного лекарственного средства с повышенной биодоступностью для лечения нейроэндокринных опухолей».

Для цитирования: Дмитриева М. В., Орлова О. Л., Ланцова А. В., Краснюк И. И. Определение оптимальных технологических условий процесса получения липосомальной лекарственной формы цифетрилина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):82–89. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-82-89>

Determination of Optimal Technological Conditions for the Process of Production a Liposomal Dosage Form of Cyphetrylin

Maria V. Dmitrieva^{1*}, Olga L. Orlova¹, Anna V. Lantsova¹, Ivan I. Krasnyuk²

¹ FSBI "National Medical Research Center of Oncology. N. N. Blokhin", 24, Kashirskoe highway, Moscow, 115478, 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: Maria V. Dmitrieva. E-mail: dmitrieva.m@ronc.ru

ORCID: Maria V. Dmitrieva – <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>; Olga L. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>; Anna V. Lantsova – <https://orcid.org/0000-0002-0650-2023>; Ivan I. Krasnyuk – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Received: 07.09.2021

Revised: 04.02.2022

Published: 25.02.2022

© Дмитриева М. В., Орлова О. Л., Ланцова А. В., Краснюк И. И., 2022

© Dmitrieva M. V., Orlova O. L., Lantsova A. V., Krasnyuk I. I., 2022

Abstract

Introduction. The Laboratory for the development of dosage forms of the N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russian Federation has developed a composition of an injectable liposomal dosage form based on soybean phosphatidylcholine, a hydrophobic analog of the hypothalamic hormone somatostatin – cyphetrylin, intended for the treatment of neuroendocrine tumors.

Aim. Determination of optimal technological conditions for the process of obtaining a liposomal dosage form of cyphetrylin.

Materials and methods. The study used the substance cyphetrylin synthesized in the of Chemical Synthesis Laboratory of the N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russian Federation; soybean phosphatidylcholine S PC and polyethylene glycol-2000-distearoylphosphatidylethanolamine, produced by Lipoid GmbH (Germany); cholesterol $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Japan). For the preparation of phospholipid vesicles loaded with cyphetrylin and "empty", the methods of lipid film hydration with subsequent extrusion or homogenization of the dispersion of multi-layer liposomes were used. The obtained liposomal samples were evaluated by quality indicators – the effectiveness of the inclusion of cyphetrylin in vesicles, their average size and surface charge (zeta potential), the viscosity of the dispersion. To evaluate these characteristics, the methods of spectrophotometry, laser scattering spectroscopy, determination of the electrophoretic mobility of particles and viscometry were used.

Results and discussion. It was found that the most suitable organic solvent for obtaining a solution of cyphetrylin and lipid components of the dosage form is chloroform. The duration of the drying period of the lipid film under vacuum to remove the residual solvent is determined by the ratio of the volume of the distillation flask used and the mass of its loading its loading. At the same time, hydration off the lipid film with water for injection should be carried out under conditions of low-pressure and room temperature. To obtain a dispersion of single-layer cyphetrylin liposomes of the required size, an extrusion method using nylon and polycarbonate membranes with a filter pore diameter of 0.22 and 0.2 μm , respectively, was chosen.

Conclusion. The optimal technological conditions for the process of obtaining a liposomal dosage form in the form of a dispersion of a hydrophobic analog of the hypothalamic hormone somatostatin – cyphetrylin are determined.

Keywords: liposomes, dosage form, dispersion, technological factors, cyphetrylin, soybean phosphatidylcholine

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Maria V. Dmitrieva – research design, obtaining and analyzing data, writing the text of the article. Olga L. Orlova – research design, data analysis. Anna V. Lantsova – obtaining and analyzing data, review of publications. Ivan I. Krasnyuk – research design, verification of the final version of the article.

Funding. The study was conducted within the framework of the state task No. AAAA20-120031190026-9 "Creation of an innovative drug with increased bioavailability for the treatment of neuroendocrine tumors".

For citation: Dmitrieva M. V., Orlova O. L., Lantsova A. V., Krasnyuk I. I. Determination of optimal technological conditions for the process of production a liposomal dosage form of cyphetrylin. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):82–89. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-82-89>

ВВЕДЕНИЕ

Химиотерапия гормонозависимых опухолей остается одним из актуальных направлений в лечении онкологических заболеваний. Повышенное внимание к проблеме гормонозависимости опухолей в аспекте их возможной химиотерапии создает условия для применения гормонов в качестве противоопухолевых средств. В этом ключе ведется активный поиск противоопухолевых соединений среди агентов, способных избирательно воздействовать на гормонозависимые опухоли. К таким агентам относятся пептидные гормоны гипоталамуса, в частности соматостатин [1].

Цифетрилин, аналог гипоталамического гормона соматостатина, представляет собой защищенный по функциональным группам пентапептид – метиловый эфир N^α-трет-бутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранил-L-цистеинил-L-фенилаланил-D-триптофил-N^α-карбобензоксид-L-лизил-L-треонина, синтезированный в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России. По результатам изучения гормональной, цитотоксической и противоопухолевой активности цифетрилин как перспективный препарат для лече-

ния ряда злокачественных новообразований был отобран для дальнейших исследований. В связи с гидрофобной природой цифетрилина на его основе была создана таблетированная лекарственная форма (ЛФ), которая к настоящему времени прошла I стадию клинических исследований у пациентов с нейроэндокринными опухолями. С целью повышения эффективности и снижения побочных эффектов в качестве альтернативы таблеткам предложена композиция инъекционной ЛФ цифетрилина на основе липосом [2–5].

Липосомы представляют собой сферические липидные везикулы, состоящие из одного или нескольких фосфолипидных бислоев и водной внутренней полости. В зависимости от количества мембранных бислоев их можно разделить на одно-, олиго- или многослойные везикулы, которые образуются в результате самоорганизации фосфолипидов в контакте с гидрофильной средой. Такое поведение увеличивает их растворимость в среде и снижает отношение поверхности к объему [6]. Хотя везикулярная структура характеризуется минимальным термодинамическим уровнем энергии, для образования пузырьков в сис-

тому необходимо подать минимальное количество энергии, называемое «энергией активации». Эта требуемая подводимая энергия может быть физической, механической, термической, акустической или их комбинацией [7]. Существует множество различных способов приготовления липосом, при этом выбор подходящего метода зависит от нескольких факторов: физико-химических характеристик липосомных компонентов и загружаемого лекарственного средства; токсичности и концентрации загружаемого вещества; типа среды, в которой диспергированы липосомы; размера и периода полураспада, желаемые для успешного применения; стоимости, воспроизводимости и применимости в отношении крупномасштабного производства для клинических целей и др. [8].

Целью настоящей работы являлось определение оптимальных технологических условий процесса получения липосомальной ЛФ (ЛЛФ) гидрофобного аналога гипоталамического гормона соматостатина – цифетрилина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы: субстанция цифетрилина серии 010220, $\geq 97\%$ (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), соевый фосфатидилхолин (СФХ) S PC $\geq 98\%$ (Lipoid GmbH, Германия), холестерин $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Япония), полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтанолламин (ПЭГ-ДСФЭ) 18:0/18:0 (Lipoid GmbH, Германия); хлороформ (х.ч.), стабилизированный этанолом (ООО ТД «ХИММЕД», Россия); спирт этиловый 95 % (ООО «Гиппократ», Россия), вода для инъекций ФС.2.2.0019.18, вода очищенная ФС.2.2.0020.18; нейлоновые мембраны NNG025100, NXG025100, NRG025100 с размером пор 1,2; 0,45 и 0,22 мкм (ООО «Палл Евразия», Россия), поливинилиденфторидовые мембраны GVHP02500 с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd., Ирландия), поликарбонатные мембраны Nuclepore 110606 с размером пор 0,2 мкм (Whatman International Ltd., Великобритания), полиэфирсульфоновые мембраны Express® PLUS GPWP02500 с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd., Ирландия), фильтр из сложных эфиров целлюлозы GSWP02500 с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd., Ирландия).

Оборудование: весы лабораторные GF600 (AND, Япония), роторный испаритель Hei-VAP Advantage с отгонной колбой на 2 л (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия), экструдеры Lipex™ на 10 и 100 мл (Northern Lipids Inc., Канада), микрофлюидизер M-110S (Microfluidizer, США), спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия), дзетасайзер Nanoseries Nano-ZS 3600 (Malvern, Великобритания), вискозиметр Vibro Viscometer SV-10 (AND, Япония).

Методы

Получение липосом с цифетрилином. Многослойные липосомы (МСЛ) цифетрилина получали плечным методом, однослойные липосомы (ОСЛ) – ме-

тодом экструзии и гомогенизации, предварительно профильтровав дисперсию МСЛ через нейлоновые фильтры с диаметром пор 1,2 и 0,45 мкм. «Пустые» липосомы получали, как и липосомы с цифетрилином, но без добавления активной субстанции в состав хлороформного раствора липидов.

Количественное содержание действующего вещества в липосомах определяли методом спектрофотометрии с использованием рабочего стандартного образца (СО) при длине волны 282 ± 2 нм. В качестве раствора сравнения использовали раствор «пустых» липосом. Методика количественного анализа цифетрилина представлена в работе [4]. **Эффективность включения (ЭВ)** определяли как отношение концентрации цифетрилина в дисперсии после фильтрации ($C_{\text{фил.}}$) к его концентрации в дисперсии после получения ($C_{\text{пол.}}$), выраженное в процентах. Анализ **диаметра липосом** проводили методом корреляционной спектроскопии светорассеяния, **дзета-потенциала (ζ-потенциала)** – посредством измерения их электрофоретической подвижности. Значения **динамической вязкости** образцов дисперсии определяли на вибрационном вискозиметре при температуре 21–25 °С. Методики пробоподготовки и проведения анализа диаметра и дзета(ζ)-потенциала (ζ-потенциала) липосом и вязкости дисперсии представлены в работе [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее распространенной технологией производства липосом является метод липидной пленки, который впервые был описан и использован для приготовления липосом А. Бенгхемом и его коллегами в 1965 г. Существует несколько модифицированных версий оригинальной техники, однако выделяют общие основные этапы процесса: 1) приготовление липидной пленки; 2) гидратация липидной пленки; 3) получение ОСЛ требуемого размера [9].

Получение липидной пленки

Исходя из свойств компонентов ЛФ (таблица 1) для растворения цифетрилина и липидов используют легколетучий растворитель хлороформ. Полученный раствор переливают в круглодонную колбу и отгоняют органический растворитель в условиях пониженного давления при температуре водяной бани +40 °С и скорости вращения ротора 90 ± 5 оборотов в минуту. По мере загущения раствора скорость вращения постепенно снижают, обеспечивая достаточную скорость отгона растворителя и равномерное распределение пленки на стенках колбы.

Для удаления остаточного хлороформа пленку выдерживают под вакуумом до постоянной массы. При этом период сушки пленки определяется соотношением вместимости используемой круглодонной колбы и ее загрузкой (рисунок 1). Так, при использова-

Таблица 1. Растворимость компонентов ЛЛФ цифетрилина в органических растворителях

Table 1. Solubility of cyphetrylin liposomal dosage form (LDF) components in organic solvents

Компонент ЛЛФ Component LDF	Органический растворитель Organic solvent			
	Хлороформ Chloroform	Метанол Methanol	Этанол Ethanol	Ацетон Acetone
Цифетрилин Cyphetrylin	Растворим Soluble	–	Мало растворим Slightly soluble	
СФХ SPC	Растворим Soluble			Практически нерастворим Practically insoluble
Холестерин Cholesterol	Легко растворим Easily soluble	Практически нерастворим Practically insoluble	Умеренно растворим Moderately soluble	
ПЭГ-ДСФЭ PEG-DSPE	Растворим Soluble			Практически нерастворим Practically insoluble

нии колбы вместимостью 1 л и массе загрузки 0,511 г период полного удаления хлороформа составляет в среднем не более 40 мин, объемом 2 л и массе загрузки 1,533 г – 50 мин. С увеличением высушиваемой массы в колбе объемом 2 л в 1,5 раза отмечается удлинение этого периода на 30 мин.

Гидратация липидной пленки

Для образования МСЛ цифетрилина липидную пленку гидратируют водой для инъекций. В ходе исследования было отмечено, что большое значение при гидратации имеет температура дисперсионной среды, которая обуславливает качество липосомальной дисперсии цифетрилина. С увеличением температуры гидратанта отмечается повышение вязкости дисперсии и формируются более стабильные липосомы, что характеризуется повышением их поверхностного заряда. При этом ЭВ цифетрилина сохраняет-

ся практически на одном уровне, а размеры везикул не превышают 225 нм (таблица 2).

Также при гидратации пленки необходимо учитывать давление окружающей среды. Ранее при исследовании влияния вакуума на стадии гидратации при получении ЛЛФ гидрофобных веществ нами было установлено, что пониженное давление оказывает положительный эффект на процесс формирования МСЛ [10]. Поэтому при разработке технологии получения липосомального цифетрилина был проведен сравнительный анализ дисперсий МСЛ цифетрилина, образованных при различных уровнях давления – 1000, 500 и 100 мбар. Согласно данным таблицы 3 со снижением давления среды при гидратации отмечается образование менее вязких дисперсий, но более крупных липосом с высоким поверхностным зарядом. При этом вариабельность данного технологического параметра не влияет на ЭВ цифетрилина в бислой.

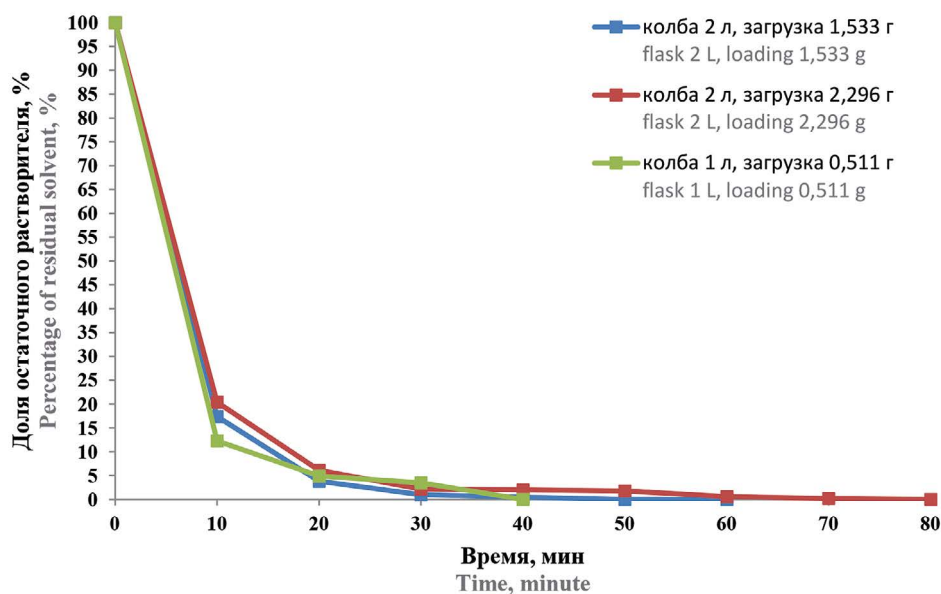


Рисунок 1. График удаления остатков хлороформа из липидной пленки

Figure 1. Graph of removal of chloroform residues from the lipid film

Таблица 2. Зависимость характеристик липосом цифетрилина от температуры воды для инъекций при гидратации липидной пленки

Table 2. Dependence of the characteristics of cyphetrylin liposomes on the temperature of the water for injection during the hydration of the lipid film

Показатели качества Quality indicators	Температура воды для инъекций, °C Water temperature for injection, °C			
	20 ± 1	25 ± 1	30 ± 1	40 ± 1
Вязкость, мПа · с Viscosity, mPa · s	7,2 ± 0,9	8,5 ± 1,2	9,9 ± 1,0	11,3 ± 1,0
ЭВ, % EE, %	100 ± 0,6	99,8 ± 0,8	99,7 ± 0,6	100 ± 1,0
ζ-потенциал, мВ ζ-potential, mV	-(17,6 ± 1,6)	-(19,7 ± 1,1)	-(19,6 ± 1,8)	-(23,4 ± 1,5)
Размер липосом, нм Liposome size, nm	208 ± 15 (98 %) / 16 ± 3 (2 %)	210 ± 15 (99 %) / 20 ± 5 (1 %)	195 ± 10 (99 %) / 11 ± 3 (1 %)	206 ± 12 (99 %) / 11 ± 3 (1 %)

Таблица 3. Влияние уровня давления на характеристики липосомальной дисперсии цифетрилина при гидратации липидной пленки

Table 3. Effect of the pressure level on the characteristics of the liposomal dispersion of cyphetrylin during the hydration of the lipid film

Показатели качества Quality indicators	Значение уровня давления, мбар Pressure level value, mbar		
	1000 ± 5	500 ± 5	100 ± 5
Вязкость, мПа · с Viscosity, mPa · s	7,3 ± 0,9	6,6 ± 0,8	5,5 ± 1,2
ЭВ, % EE, %	100 ± 0,8		
ζ-потенциал, мВ ζ-potential, mV	-(21,4 ± 1,6)	-(21,7 ± 1,7)	-(32,4 ± 1,3)
Размер липосом, нм Liposome size, nm	206 ± 14 (98 %) / 16 ± 3 (2 %)	353 ± 18 (97 %) / 27 ± 5 (3 %)	489 ± 18 (99 %) / 31 ± 3 (1 %)

Таким образом, гидратацию липидной пленки следует проводить при комнатной температуре в условиях пониженного атмосферного давления.

Получение ОСЛ цифетрилина

Эффективность химиотерапевтических препаратов в липосомальной форме достигается благодаря направленному транспорту и накоплению везикул непосредственно в опухолевой ткани. Определяющим фактором для проникновения в опухоль липосомальных носителей является их размер, который должен составлять не более 200 нм [11]. Для уменьшения размеров липосом, полученных в процессе гидратации пленки, применяют различные методы их измельчения.

Золотым стандартом в технологии производства липосомальных препаратов и одним из широко используемым методом получения ОСЛ является *экструзия*. Суть метода заключается в пропускании липосомальной дисперсии через мембранный фильтр с определенным размером пор под давлением с использованием специального оборудования – экструдера или подходящей индивидуальной установки. В отличие от других способов измельчения липосом процесс экструзии включает также фильтрацию дисперсии от видимых и невидимых механических час-

тиц, в том числе от «не включенного» в везикулы активного гидрофобного вещества, и стерилизацию препарата при соблюдении асептических условий. Эффективность экструзии определяется рядом факторов таких как природа материала и размер пор мембранного фильтра, состав липосом и концентрация липидов, скорость потока дисперсии и число циклов ее пропускания, величина давления [12].

При выборе оптимального режима экструзии МСЛ цифетрилина оценивали эффективность 5 типов мембран – нейлоновых, поликарбонатных, полиэфирсульфоновых, целлюлозных, поливинилиденфторидовых. Профильтрованную дисперсию пропускали от 1 до 9 раз под давлением 1,0–1,2 бар через вышеуказанные фильтры.

Согласно данным диаграмм (рисунок 2) все фильтры позволяют получить однородные липосомы цифетрилина оптимального размера. При сравнении значений поверхностного заряда установлено, что экструзия МСЛ цифетрилина способствует частичной дестабилизации липосомальной структуры, характеризующейся снижением ζ-потенциала везикул (рисунок 3). В то же время при использовании поликарбонатных и полиэфирсульфоновых мембран после 3 пропусканий отмечается максимальное падение ζ-потенциала с последующим его постепенным уве-

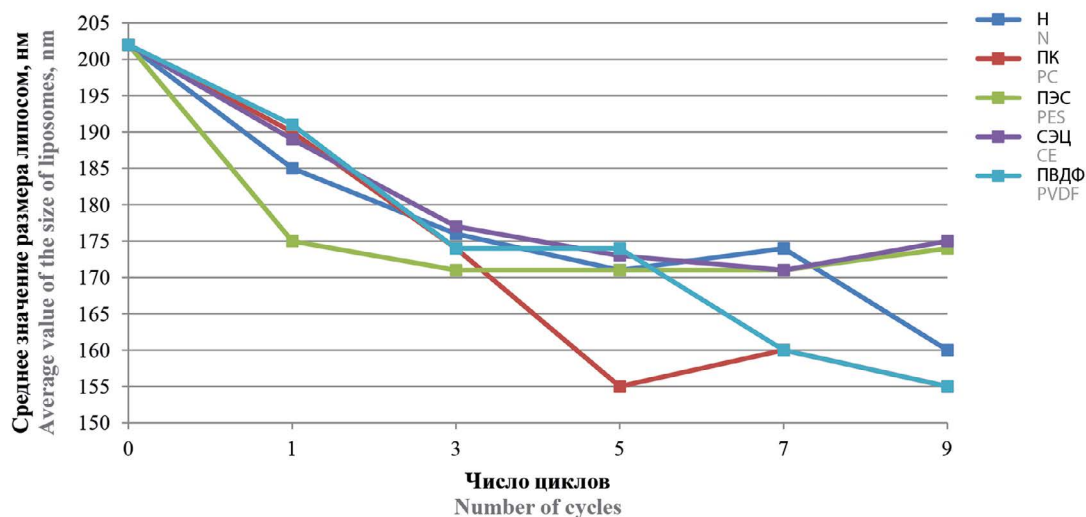


Рисунок 2. Среднее значение размера везикул цифетрилина при экстракции с различными типами фильтров

Figure 2. The average value of the size of cyphetrylin vesicles during extrusion with various types of filters

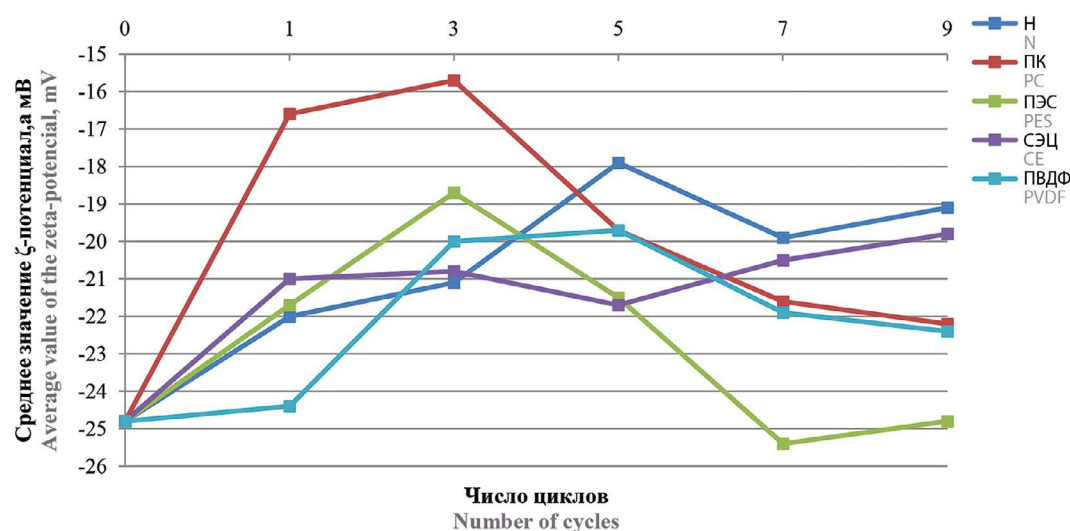


Рисунок 3. Среднее значение ζ -потенциала везикул цифетрилина при экстракции с различными типами фильтров

Figure 3. The average value of the ζ -potential of cyphetrylin vesicles during extrusion with various types of filters

личением. 100 % ЭВ цифетрилина сохраняется только при использовании нейлоновых и поликарбонатных фильтров (рисунок 4). В остальных случаях отмечается снижение инкапсулирования по мере роста числа циклов, что обусловлено сорбцией активного вещества на фильтре.

Таким образом, обобщая полученные результаты, можно сделать вывод о целесообразности применения поликарбонатных и нейлоновых фильтров для экстракции МСЛ цифетрилина.

В отличие от экстракции *гомогенизация* под высоким давлением позволяет получать липосомальные препараты в промышленных масштабах, благодаря высокой производительности метода. Жидкий

образец в гомогенизаторе под высоким давлением продавливается через отверстие и затем ударяется о стенку, выполненной из нержавеющей стали. Циркулирование дисперсии под влиянием высокого давления по системе гомогенизатора в течение определенного периода времени приводит к постепенному снижению размера липосом [13]. В ходе исследования 100 мл профильтрованной дисперсии МСЛ гомогенизировали в камере микрофлюидайзера под давлением 2,8 бар с отбором проб через каждый цикл прохождения дисперсии по системе.

Согласно данным, представленным в таблице 4, при гомогенизации отмечаются колебания в размерах липосом цифетрилина: после уменьшения диамет-

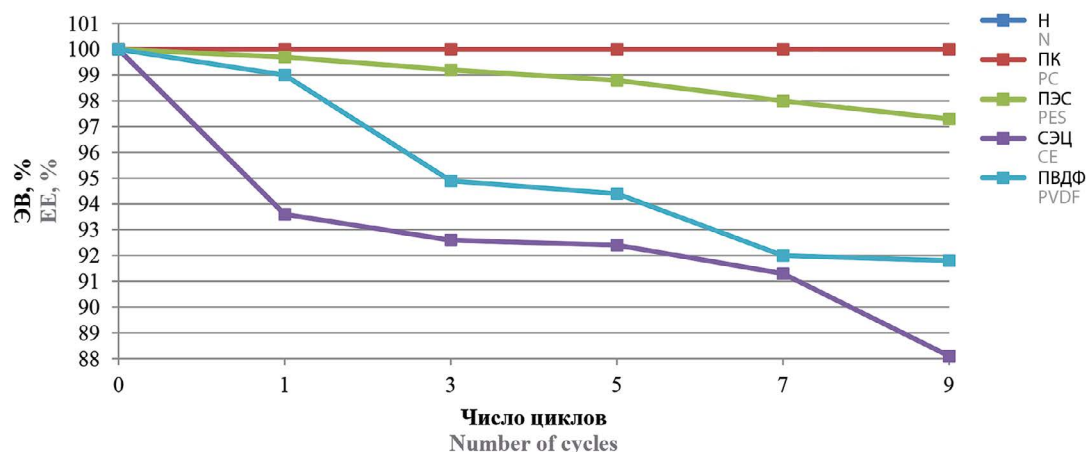


Рисунок 4. ЭВ цифетрилина в липосомы при экструзии с различными типами фильтров

Figure 4. EE of cyphetrylin in liposomes during extrusion with various types of filters

ра везикул последующее их пропускание через гомогенизатор приводит к укрупнению частиц. При этом везикулы требуемого размера могут быть получены уже после одного цикла гомогенизации, что составляет в данных условиях 15 сек. Кроме того, в процессе гомогенизации дисперсии наблюдаются волнообразные изменения ζ -потенциала везикул, средние значения которого соответственно находятся в диапазоне $-14,9$ – $20,8$ мВ.

Однако, несмотря на эффективность метода с точки зрения уменьшения размера везикул, при гомогенизации отмечается значительное снижение содержания лекарственного вещества в липосомах (рисунок 5), что вероятно обусловлено нагреванием дисперсии и частичным разрушением бислоя. В связи

с этим можно сделать вывод о нецелесообразности использования данного метода в технологии получения ЛЛФ цифетрилина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных фармацевтических исследований изучены различные параметры основных стадий технологии получения ЛЛФ цифетрилина с учетом гидрофобной природы активной субстанции. На основании сравнительного анализа характеристик экспериментальных образцов полупродуктов определены оптимальные технологические условия получения инъекционной ЛФ цифетрилина в виде липосомальной дисперсии, пригодной для доклинических исследований.

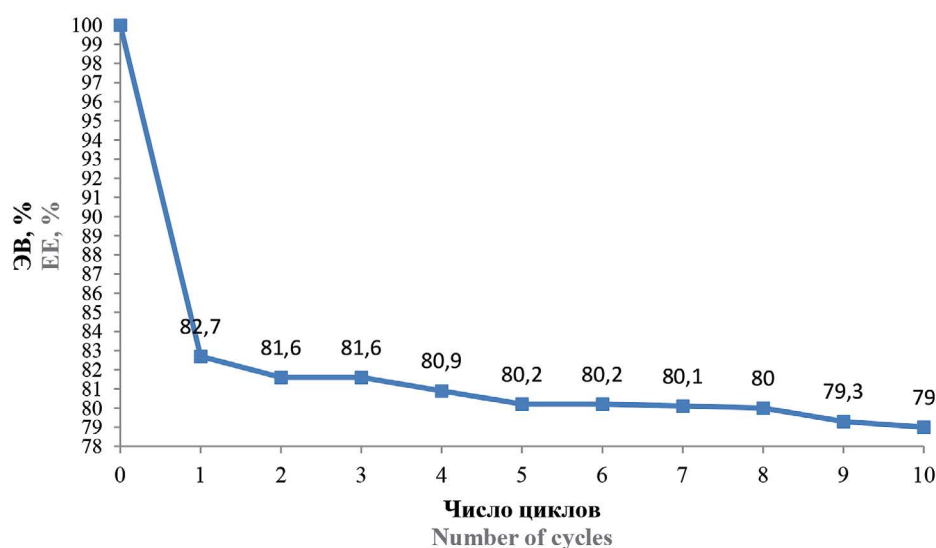


Рисунок 5. ЭВ цифетрилина в липосомы при гомогенизации

Figure 5. EE of cyphetrylin in liposomes during homogenization

Таблица 4. Характеристики липосомальной дисперсии цифетрилина при гомогенизации

Table 4. Characteristics of the liposomal dispersion of cyphetrylin during homogenization

Число циклов Number of cycles	Размер везикул по фракциям, нм Vesicle size by fraction, nm	ζ-потенциал везикул, мВ ζ-vesicle potential, mV
0	226 ± 19 (100 %)	–(31,4 ± 1,6)
1	129 ± 8 (98 %) / 21 ± 2 (2 %)	–(19,6 ± 1,2)
2	166 ± 8 (84 %) / 48 ± 5 (16 %)	–(14,9 ± 1,1)
3	138 ± 7 (82 %) / 46 ± 3 (18 %)	–(19,1 ± 1,9)
4	167 ± 9 (66 %) / 58 ± 5 (33 %) / 11 ± 2 (1 %)	–(15,1 ± 1,2)
5	102 ± 6 (91 %) / 26 (9 %)	–(16,4 ± 1,2)
6	98 ± 8 (87 %) / 32 ± 3 (13 %)	–(17,2 ± 0,8)
7	115 ± 10 (81 %) / 31 ± 3 (19 %)	–(20,8 ± 1,5)
8	65 ± 5 (100 %)	–(18,4 ± 1,3)
9	91 ± 7 (94 %) / 19 ± 2 (6 %)	–(19,1 ± 2,1)
10	72 ± 9 (100 %)	–(20,5 ± 0,6)

ЛИТЕРАТУРА

- Борисова Л. М., Киселева М. П., Осипов В. Н., Сушинина Л. П., Устинкина С. В., Смирнова Л. И., Шпрах З. С. Цитотоксические аналоги цифетрилина (сообщение II). *Российский биотерапевтический журнал*. 2017;16(2):23–29. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-23-29.
- Осипов В. Н., Сушинина Л. П., Устинкина С. В., Смирнова Л. И., Шпрах З. С. Цитотоксические аналоги цифетрилина (сообщение I). *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(4):85–88. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-85-88.
- Коняева О. И., Кульбачевская Н. Ю., Ермакова Н. П., Чалей В. А., Меркулова И. Б., Абрамова Т. В., Бухман В. М., Шпрах З. С. Предклиническое токсикологическое изучение аналога гипоталамического гормона цифетрилина. *Российский биотерапевтический журнал*. 2018;17(2):63–70. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-63-70.
- Dmitrieva M., Shprakh Z., Orlova O., Ignatyeva E., Lantsova A., Nikolaeva L., Krasniuk I. Selection of the composition of a liposomal dosage form of a russian somatostatin analogue with antitumor activity. *Inter J Appl Pharm*. 2020;12(6):65–68. DOI: 10.22159/ijap.2020v12i6.39253.
- Shprakh Z. Somatostatin analogues for the treatment of neuroendocrine tumours. Dosage forms and routes of administration (review). *Inter J Appl Pharm*. 2020;12(2):6–11. DOI: 10.22159/ijap.2020v12i2.36558.
- Manai E. B., Abucafy M. P., Chiari-Andréo B. G., Silva B. L., Oshiro-Junior J. A., Chiavacci L. A. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;12:4991–5011. DOI: 10.2147/IJN.S133832.
- Zarrabi A., Abadi M. A. A., Khorasani S., Mohammadabadi M. R., Jamshidi A., Torkaman S., Taghavi E., Mozafari M. R., Rasti B. Nanoliposomes and tocosomes as multifunctional nanocarriers for the encapsulation of nutraceutical and dietary molecules. *Molecules*. 2020;25(3):638. DOI: 10.3390/molecules25030638.
- Bozzuto G., Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:975–99. DOI: 10.2147/IJN.S68861.
- Németh Z., Pallagi E., Dobó D. G., Csóka I. A proposed methodology for a risk assessment-based liposome development process. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1164. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121164.
- Dmitrieva M. V., Timofeeva T. A., Lugen B., Orlova O. L., Oborotova N. A., Krasniuk I. I. Hydration of the lipid film under normal and low-pressure in the technology of liposomal preparations. 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants. *MedChem Russia 2019. Abstract book*. Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 2019. P. 339.

- Allahou L. W., Madani S. Y., Seifalian A. Investigating the application of liposomes as drug delivery systems for the diagnosis and treatment of cancer. *Int J Biomater*. 2021;2021:3041969. DOI: 10.1155/2021/3041969.
- Дмитриева М. В., Лугэн Бу, Оборотова Н. А., Краснюк И. И., Краснюк И. И. (мл.), Беляцкая А. В., Степанова О. И., Боков Д. О., Нарышкин С. Р., Мазяркин Е. В. Метод экстракции в технологии получения липосом. *Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2020;3:88–97.
- Jaradat E., Weaver E., Meziane A., Lamprou D. A. Microfluidics technology for the design and formulation of nanomedicines. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(12):3440. DOI: 10.3390/nano11123440.

REFERENCES

- Borisova L. M., Kiseleva M. P., Osipov V. N., Sushinina L. P., Ustinkina S. V., Smirnova L. I., Shprakh Z. S. Cyphetrylin cytotoxic analogues (report II). *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2017;16(2):23–29. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-23-29.
- Osipov V. N., Sushinina L. P., Ustinkina S. V., Smirnova L. I., Shprakh Z. S. Cyphetrylin cytotoxic analogues (report I). *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2016;15(4):85–88. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-85-88.
- Konyaeva O. I., Kulbachevskaya N. Yu., Ermakova N. P., Chaley V. A., Merkulova I. B., Abramova T. V., Buchman V. M., Shprakh Z. S. Pre-clinical toxicological study of analogue of hypothalamic hormone cyphetrylin. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2018;17(2):63–70. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-63-70.
- Dmitrieva M., Shprakh Z., Orlova O., Ignatyeva E., Lantsova A., Nikolaeva L., Krasniuk I. Selection of the composition of a liposomal dosage form of a russian somatostatin analogue with antitumor activity. *Inter J Appl Pharm*. 2020;12(6):65–68. DOI: 10.22159/ijap.2020v12i6.39253.
- Shprakh Z. Somatostatin analogues for the treatment of neuroendocrine tumours. Dosage forms and routes of administration (review). *Inter J Appl Pharm*. 2020;12(2):6–11. DOI: 10.22159/ijap.2020v12i2.36558.
- Manai E. B., Abucafy M. P., Chiari-Andréo B. G., Silva B. L., Oshiro-Junior J. A., Chiavacci L. A. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;12:4991–5011. DOI: 10.2147/IJN.S133832.
- Zarrabi A., Abadi M. A. A., Khorasani S., Mohammadabadi M. R., Jamshidi A., Torkaman S., Taghavi E., Mozafari M. R., Rasti B. Nanoliposomes and tocosomes as multifunctional nanocarriers for the encapsulation of nutraceutical and dietary molecules. *Molecules*. 2020;25(3):638. DOI: 10.3390/molecules25030638.
- Bozzuto G., Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:975–99. DOI: 10.2147/IJN.S68861.
- Németh Z., Pallagi E., Dobó D. G., Csóka I. A proposed methodology for a risk assessment-based liposome development process. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1164. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121164.
- Dmitrieva M. V., Timofeeva T. A., Lugen B., Orlova O. L., Oborotova N. A., Krasniuk I. I. Hydration of the lipid film under normal and low-pressure in the technology of liposomal preparations. 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants. *MedChem Russia 2019. Abstract book*. Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 2019. P. 339.
- Allahou L. W., Madani S. Y., Seifalian A. Investigating the application of liposomes as drug delivery systems for the diagnosis and treatment of cancer. *Int J Biomater*. 2021;2021:3041969. DOI: 10.1155/2021/3041969.
- Dmitrieva M. V., Lugen Bu, Oborotova N. A., Krasnyuk I. I., Krasnyuk I. I. (jr.), Belyackaya A. V., Stepanova O. I., Bokov D. O., Naryshkin S. R., Mazyarkin E. V. The method of extrusion in the technology of obtaining liposomes. *Vestnik VGU, Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2020;3:88–97. (In Russ.)
- Jaradat E., Weaver E., Meziane A., Lamprou D. A. Microfluidics technology for the design and formulation of nanomedicines. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(12):3440. DOI: 10.3390/nano11123440.

Количественное определение ивермектина в составе полимерных микрочастиц

А. И. Могайбо^{1,2*}, А. В. Мелешко^{1,2}, В. В. Суслов¹, О. И. Рыбченко¹, Ю. М. Домнина¹, С. А. Кедик¹

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: Могайбо Анастасия Игоревна. E-mail: mogaibo@yandex.ru

ORCID: А. И. Могайбо – <https://orcid.org/0000-0003-3759-2866>; А. В. Мелешко – <https://orcid.org/0000-0002-1073-5073>; В. В. Суслов – <https://orcid.org/0000-0002-9578-2492>; О. И. Рыбченко – <https://orcid.org/0000-0002-1326-3577>; Ю. М. Домнина – <https://orcid.org/0000-0002-2745-9431>; С. А. Кедик – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>.

Статья поступила: 01.07.2021

Статья принята в печать: 19.01.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Ивермектин известен как ветеринарное средство с широким спектром действия в отношении эндо- и экзопаразитов сельскохозяйственных животных, что делает его применение перспективным. Поэтому в настоящее время исследуется возможность создания пролонгированных парентеральных лекарственных форм с использованием полимерных биоразлагаемых носителей. Для осуществления их контроля качества необходима методика количественного определения активного вещества. Большинство предложенных ранее методик отличаются трудоемкой пробоподготовкой, сложным составом подвижной фазы или длительным временем анализа, поэтому в ходе разработки инъекционного пролонгированного препарата ивермектина на основе микрочастиц поликапролактона была предложена новая методика количественного определения ивермектина, отличающаяся простотой и пригодная для применения на производстве.

Цель. Разработка методики количественного определения ивермектина в составе микрочастиц поликапролактона и проведение ее валидации.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали микрочастицы поликапролактона содержащие инкапсулированный ивермектин. Методика количественного определения ивермектина в исследуемом образце разрабатывалась на высокоэффективном жидкостном хроматографе Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенный диодно-матричным детектором.

Результаты и обсуждение. В настоящей работе изучены различные условия количественного определения ивермектина в составе микрочастиц поликапролактона. На основании полученных данных и результатов разработана методика, обладающая оптимальной пробоподготовкой и условиями проведения анализа.

Заключение. В результате проведения разработки методики выбраны условия проведения анализа, которые позволяют оценивать количественное содержание ивермектина в образце. Проведена валидация методики по параметрам специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, повторяемость и внутрилабораторная прецизионность.

Ключевые слова: ивермектин, полимерные микрочастицы, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. В. В. Суслов и С. А. Кедик придумали и разработали эксперимент. С. А. Кедик, В. В. Суслов, Ю. М. Домнина и О. И. Рыбченко синтезировали образцы и провели их исследование. А. И. Могайбо и А. В. Мелешко разработали аналитическую методику. А. И. Могайбо и А. В. Мелешко участвовали в обработке данных. О. И. Рыбченко и Ю. М. Домнина проводили теоретические расчеты. Все авторы участвовали в написании текста статьи и обсуждении результатов.

Для цитирования: Могайбо А. И., Мелешко А. В., Суслов В. В., Рыбченко О. И., Домнина Ю. М., Кедик С. А. Количественное определение ивермектина в составе полимерных микрочастиц. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):90–97. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-90-97>

Quantitative Determination of Ivermectin in Polymer Microspheres

Anastasiia I. Mogaibo^{1,2*}, Anastasiia V. Meleshko^{1,2}, Vasilii V. Suslov¹, Oxana I. Rybchenko¹, Yuliya M. Domnina¹, Stanislav A. Kedik¹

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: Anastasiia I. Mogaibo. E-mail: mogaibo@yandex.ru

ORCID: Anastasiia I. Mogaibo – <https://orcid.org/0000-0003-3759-2866>; Anastasiia V. Meleshko – <https://orcid.org/0000-0002-1073-5073>;

Vasilii V. Suslov – <https://orcid.org/0000-0002-9578-2492>; Oxana I. Rybchenko – <https://orcid.org/0000-0002-1326-3577>; Yuliya M. Domnina – <https://orcid.org/0000-0002-2745-9431>;

Stanislav A. Kedik – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>.

Received: 01.07.2021

Revised: 19.01.2022

Published: 25.02.2022

Abstract

Introduction. Ivermectin is known as a veterinary agent with a wide spectrum of action against endo- and exoparasites of farm animals, which makes its use promising. Therefore, the possibility of creating prolonged parenteral dosage forms using polymer biodegradable carriers is currently being investigated. To carry out their quality control, a method of quantitative determination of the active substance is necessary. Most of

the previously proposed methods are characterized by time-consuming sample preparation, complex composition of the mobile phase or a long analysis time, therefore, during the development of an injectable prolonged preparation of ivermectin based on polycaprolactone microparticles, a new method for the quantitative determination of ivermectin was proposed, which is simple and suitable for use in production.

Aim. Development of a method for the quantitative determination of ivermectin in the composition of polycaprolactone microparticles and its validation.

Materials and methods. Microparticles with ivermectin were used as the object of the study. The method of quantitative determination of ivermectin in the test sample was developed on a high-performance liquid chromatograph Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA), equipped with a diode-matrix detector.

Results and discussion. In this paper, various conditions for the quantitative determination of ivermectin in the composition of polymer microparticles are studied. Based on the obtained data and results, a method has been developed that has optimal sample preparation and analysis conditions.

Conclusion. As a result of the development, the conditions for the analysis were selected, which allow us to evaluate the quantitative content of ivermectin in the sample. The method was validated for the parameters specificity, analytical area, linearity, trueness, repeatability, intermediate precision.

Keywords: ivermectin, polymer microparticles, high-performance liquid chromatography, validation

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Vasiliy V. Suslov and Stanislav A. Kedik invented and developed an experiment. Stanislav A. Kedik, Vasiliy V. Suslov, Yuliya M. Domnina and Oxana I. Rybchenko synthesized samples and conducted their research. Anastasiia I. Mogaibo and Anastasiia V. Meleshko developed an analytical methodology. Anastasiia I. Mogaibo and Anastasiia V. Meleshko participated in data processing. Oxana I. Rybchenko and Yuliya M. Domnina carried out theoretical calculations. All the authors participated in writing the text of the article and discussing the results.

For citation: Mogaibo A. I., Meleshko A. V., Suslov V. V., Rybchenko O. I., Domnina Yu. M., Kedik S. A. Quantitative determination of ivermectin in polymer microspheres. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):90–97. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-90-97>

ВВЕДЕНИЕ

Ивермектин представляет собой амакроциклический лактон, который известен как противопаразитарное средство уже более 30 лет [1–3]. Он является ветеринарным средством с широким спектром действия, в отношении эндо- и эктопаразитов сельскохозяйственных животных, проявляет очень высокую эффективность против желудочно-кишечных и легочных нематод, а также против оводов и клещей [4–5]. Благодаря своим свойствам ивермектин считается эффективным противопаразитарным средством для крупного рогатого скота, свиней и овец [6–8]. А так же является перспективным средством в борьбе с вирусом COVID-19 [9–11].

В настоящее время активно исследуется возможность создания пролонгированных парентеральных лекарственных форм с использованием полимерных биоразлагаемых носителей [4, 5, 12]. Большинство методик, предложенных ранее для количественного определения ивермектина, отличаются трудоемкой пробоподготовкой, сложным составом подвижной фазы и длительным временем анализа [13–15]. В связи с этим в ходе разработки инъекционного пролонгированного препарата ивермектина на основе микрочастиц поликапролактона нами предложена новая методика количественного определения ивермектина.

Ранее для анализа количественного содержания ивермектина в микрочастицах поликапролактона была предложена методика, требующая использования

токсичного метанола и длительной пробоподготовки, в ходе которой проводили отделение ивермектина от поликапролактона [16].

Подготовку образцов согласно данной методике проводили следующим образом: микрочастицы с ивермектином растворяли в хлористом метиле. Полученный раствор выдерживали в течение ночи при комнатной температуре для испарения растворителя и образования пленки, содержащей полимер и ивермектин в не инкапсулированной форме. Затем в каждый образец добавляли метанол для селективного извлечения ивермектина из полимера, который полностью нерастворим в метаноле. Далее, после двухчасового перемешивания при 300 об/мин, суспензию фильтровали через нейлоновый мембранный фильтр 0,45 мкм для отделения твердого полимера от раствора ивермектина. Полученный таким образом раствор ивермектина анализировали методом ВЭЖХ.

Аналогичный метод экстракции применялся для определения ивермектина в составе полимерных имплантатов [17]. Для этого каждый имплантат измельчался, пропитывался хлористым метилом, а затем полученная суспензия проходила пробоподготовку полностью аналогичную описанной ранее.

Проанализировав известные из литературных источников методики количественного определения ивермектина [13–17] мы пришли к решению изменить состав подвижной фазы, а также упростить процесс пробоподготовки, что позволит быстрее получать

воспроизводимые результаты и делает метод доступным для рутинного анализа.

Цель работы заключалась в разработке методики количественного определения ивермектина в составе микрочастиц поликапролактона и проведение ее валидации.

В ходе разработки методики количественного определения ивермектина в составе микрочастиц поликапролактона было необходимо подобрать такие условия хроматографирования и пробоподготовки, которые бы минимизировали негативное влияние на оборудование полимера и при этом были максимально экспрессны и эффективны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Микрочастицы поликапролактона ($Mn_{cp} = 80\,000$ Да, Sigma-Aldrich, США); с инкапсулированным ивермектином (Huashu Pharmaceutical Corporation, Китай) [18].

Оборудование

Высокоэффективный жидкостный хроматограф Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США) оснащенный диодно-матричным детектором; хроматографическая колонка Luna C18 ($150 \times 4,6$ мм, диаметр частиц 5 μm , размер пор 100 Å) (Phenomenex, США); ванна ультразвуковая 1,3л/2 «Сапфир» ТТЦ (РМД); установка для фильтрования Millipore (Merck Millipore, США).

Используемые реактивы

Ивермектин (USP Reference Standard, кат. № 1354309), *n*-пропанол (х.ч., ООО «Компонент-Реактив», Россия), ацетонитрил (Panreac, Испания, HPLC-gradient grade, кат. № 200-835-2), вода для хроматографии (Milli Q или аналогичного качества), поликапролактон ($Mn_{cp} = 80\,000$ Да, Sigma-Aldrich, США); ивермектин (Huashu Pharmaceutical Corporation, Китай).

Метод ВЭЖХ

Разделение проводили в изократическом режиме.

Приготовление подвижной фазы: В стеклянную бутылку вместимостью 500 мл помещали 50 мл воды, 350 мл ацетонитрила и 100 мл 1-пропанола. Полученный раствор перемешивали и дегазировали с помощью ультразвука в течение 10 мин.

Образцы растворяли в подвижной фазе.

Приготовление стандартного раствора ивермектина: В мерную колбу вместимостью 10 мл помещали около 10 мг (точная навеска) стандартного образца ивермектина, растворяли в ацетонитриле, перемешивали и доводили объем раствора ацетонитрилом до метки.

0,1 мл полученного раствора, помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивали.

Приготовление испытуемого раствора: В мерную колбу вместимостью 10 мл помещали около 10 мг (точная навеска) образца микрочастиц, растворяли в ацетонитриле, обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин, доводили объем раствора ацетонитрилом до метки и перемешивали.

0,2 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивали.

Приготовление раствора поликапролактона: В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 50 мг поликапролактона, прибавляли около 70 мл ацетонитрила, перемешивали и обрабатывали до растворения с помощью ультразвука. Раствор доводили до метки ацетонитрилом.

0,1 мл полученного раствора, помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивали.

Анализ ивермектина проводился на колонке Phenomenex Luna C18 $150 \times 4,6$ мм с диаметром частиц 5 мкм и размером пор 100 Å. Скорость подвижной фазы 1 мл/мин. Температура колонки 40 °С. Детектирование осуществляли на длине волны 250 нм. Испытуемый образец вводили объемом 20,0 мкл. Элюирование осуществляли в изократическом режиме.

В хроматограф, выведенный на рабочий режим, последовательно вводили не менее 5 раз стандартный раствор ивермектина для анализа. На хроматограммах идентифицировали пик ивермектина и определяли его площадь. Время удерживания ивермектина в данных условиях около 4,7 мин (рисунок 1). В качестве критерия пригодности хроматографической системы приняли, что число теоретических тарелок, рассчитанное по пику ивермектина на хроматограммах стандартного образца не менее 5000.

Расчет:

Содержание ивермектина в полимерных микрочастицах (X , %) определяли по формуле:

$$X = \frac{S_{исп.} \cdot C_{Ст} \cdot 500 \cdot P}{S_{Ст} \cdot a} \cdot 100 \%,$$

где X – содержание ивермектина в образце, %; $C_{Ст}$ – концентрация раствора стандартного образца, мг/мл; $S_{Ст}$ – площадь пика стандартного образца, mAU · сек; $S_{исп.}$ – площадь пика испытуемого образца, mAU · сек; a – навеска испытуемого образца, мг; 500 – коэффициент, учитывающий разбавление испытуемого образца; P – содержание основного вещества в стандартном образце, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для сокращения времени и упрощения пробоподготовки нами было предложено проводить анализ растворов микрочастиц, а для снижения негативного воздействия поликапролактона на колонку снизить концентрацию анализируемого раствора до минимума. В качестве растворителя для пробоподготовки,

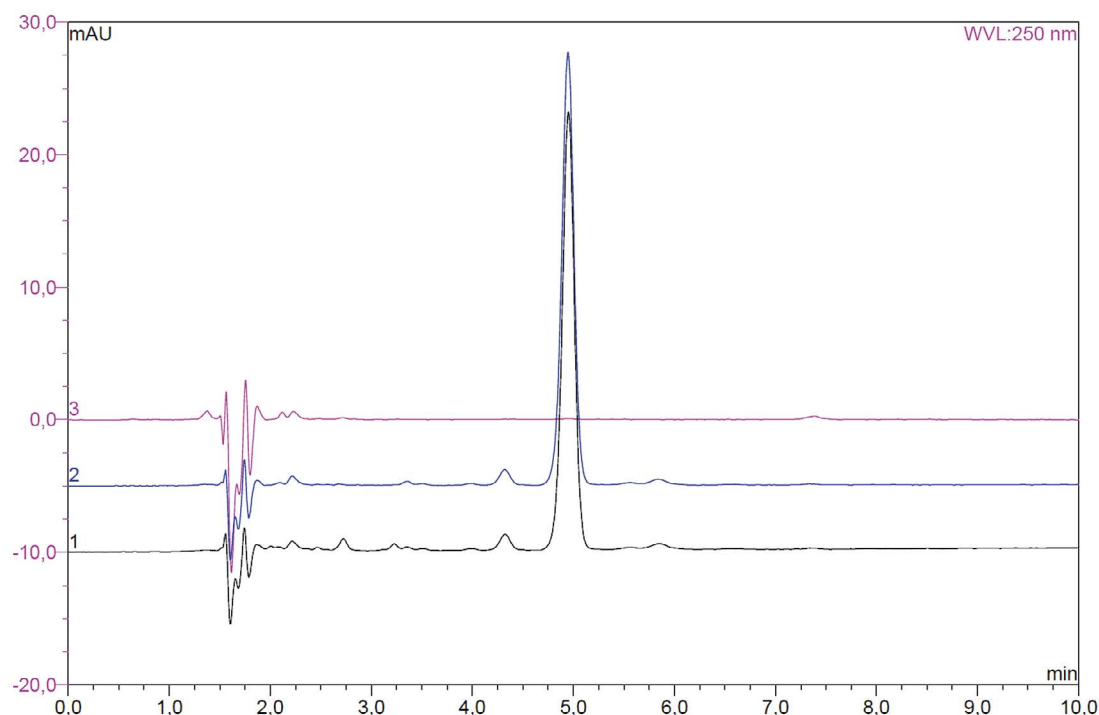


Рисунок 1. Хроматограммы идентификации пика ивермектина и определения его площади.

1 – хроматограмма раствора микрочастиц с ивермектином; 2 – хроматограмма стандартного раствора ивермектина; 3 – Хроматограмма раствора поликапролактона

Figure 1. Chromatograms of identification of the ivermectin peak and determination of its area.

1 – chromatogram of a solution of microparticles with ivermectin; 2 – chromatogram of ivermectin standard solution; 3 – chromatogram of polycaprolactone solution

нами был использован ацетонитрил, в котором анализируемые микрочастицы хорошо растворяются.

С целью уменьшения негативного действия поликапролактона на колонку при сохранении достаточной эффективности пика и возможности его адекватно интегрировать было использовано разбавление анализируемого образца микрочастиц в 1000 раз, при котором искомая концентрация ивермектина составляла около 0,010 мг/мл. После использования хроматографической колонки для лабораторного анализа полимерных микрочастиц в течение года (порядка 1500 инъекций растворов микросфер), была проведена оценка ее состояния в условиях, приведенных в сопроводительной документации. Число теоретических тарелок и фактор симметрии полученных пиков соответствовали предъявляемым в паспорте требованиям, что подтверждает то, что в подобранных условиях анализа поликапролактон действительно не оказывает негативного действия на хроматографическую колонку.

Поскольку метанол, входящий в состав подвижных фаз, используемых в разработанных ранее методиках [16, 17], является токсичным и контролируемым согласно законодательству РФ растворителем, то было принято решение заменить его на менее токсичный 1-пропанол в той же концентрации.

Полученная подвижная фаза, содержащая воду очищенную (15 % об.), 1-пропанол (34 % об.), ацетонитрил (51 % об.), имела достаточно высокую вязкость. Это приводило к тому, что давление в системе превышало верхний допустимый предел и делало подвижную фазу такого состава непригодной для использования.

Увеличение содержания ацетонитрила до 70 % об. и снижение содержания воды очищенной (10 % об.) и 1-пропанола (20 % об.) позволило получить подвижную фазу с удовлетворительной вязкостью.

Следует отметить, что более высокое содержание органических компонентов 1-пропанола и ацетонитрила в подвижной фазе будет способствовать удалению с колонки поликапролактона, что положительно скажется на сроке ее службы.

Для подтверждения пригодности разработанной методики количественного определения ивермектина в составе полимерных микрочастиц была проведена ее валидация в соответствии с требованиями ГФ XIV [19] по следующим параметрам: специфичность, правильность, линейность, прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная сходимость).

Специфичность подтверждали на основе сравнения результатов хроматографирования растворителя, раствора поликапролактона [рисунок 1 (3)], стандарт-

ного раствора ивермектина [рисунок 1(2)], раствора полимерных микрочастиц с ивермектином [рисунок 1 (1)].

На хроматограммах растворителя и раствора placebo отсутствуют пики, препятствующие определению ивермектина. Пик, соответствующий ивермектину на хроматограмме раствора полимерных микрочастиц для анализа [рисунок 1 (1)], имеет такое же время удерживания, как пик на хроматограмме стандартного раствора ивермектина для анализа [рисунок 1 (2)].

Исходя из определяемого содержания ивермектина составляющего около 50 %, аналитическая область методики находится в диапазоне 40–60 %. Линейность методики была проверена при анализе пяти концентраций, находящихся в аналитической области (8,00; 9,00; 10,00; 11,00; 12,00 мкг/мл) (таблица 1, рисунок 2).

Значение коэффициента корреляции составляет 0,9931, что удовлетворяет требованиям критерия линейности. Линейность методики установлена.

Чтобы оценить правильность разрабатываемой методики готовили методом добавок растворы, соответствующие концентрационным уровням ивермектина 80, 100, 120 %. В качестве критериев приемлемости выбрали следующие: среднее значение фактора отклика, относительное стандартное отклонение $\leq 3,0\%$, а доверительный интервал должен включать 100 % значение. Результаты валидации по параметру правильность приведены в таблице 2.

Для оценки прецизионности методики по параметру повторяемость (сходимость) было проанализировано шесть образцов полимерных микрочастиц с ивермектином одним сотрудником лаборатории в течении 1 дня на одном приборе (таблица 3). Для подтверждения внутрилабораторной прецизионности было проанализировано по 6 образцов одной серии полимерных микрочастиц с ивермектином двумя сотрудниками лаборатории в разные дни на разном оборудовании (таблица 4).

Таблица 1. Валидация методики количественного определения ивермектина в полимерных микрочастицах по параметру линейность

Table 1. Validation of the method of quantitative determination of ivermectin in polymer microparticles by the linearity parameter

Уровень концентрации, % Concentration level, %	Расчетное содержание ивермектина, мкг/мл Calculated ivermectin content, mcg/ml	Площадь пика ивермектина, mAU · мин Ivermectin peak area, mAU · min	Отклонение от номинального значения, % Deviation from the nominal value, %
80	8,00	4,3878	0,84
80	8,00	4,3684	0,28
90	9,00	4,8325	1,13
90	9,00	4,8239	0,91
100	10,00	5,1258	2,16
100	10,00	5,1220	2,25
110	11,00	5,6321	0,35
110	11,00	5,6545	0,12
120	12,00	6,1230	0,86
120	12,00	6,1171	0,75
Статистические характеристики Statistical characteristics	Результаты Results	Критерии приемлемости Eligibility criteria	
Уравнение регрессионной прямой The equation of the regression line	$y = 429,89x + 0,9198$	$y = bx + a$	
Коэффициент корреляции R^2 Correlation coefficient R^2	0,9931	$\geq 0,99$	

Относительное стандартное отклонение не должно превышать 3,0 %. Требования критерия прецизионность по параметру повторяемость (сходимость) выполнены.

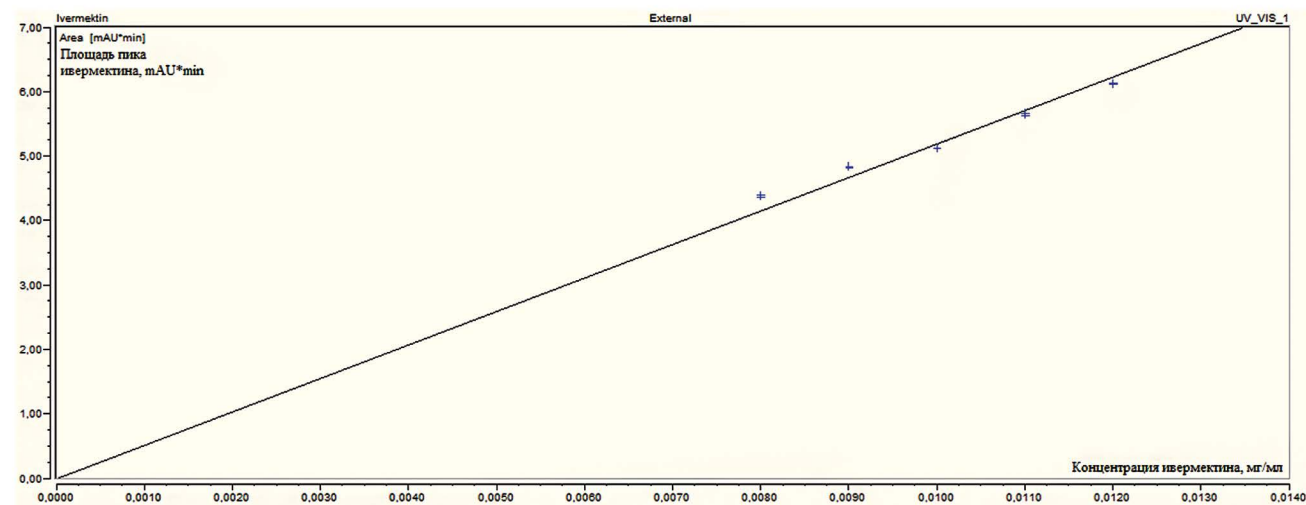


Рисунок 2. Графическое отображение параметра линейность
Figure 2. Graphical display of the Linearity parameter

Таблица 2. Валидация методики количественного определения ивермектина в полимерных микрочастицах по параметру правильность

Table 2. Validation of the method of quantitative determination of ivermectin in polymer microparticles by the correctness parameter

Уровень концентрации, % Concentration level, %	Расчетное содержание, мкг/мл Calculated content, mcg/ml	Полученное содержание, мкг/мл The resulting content, mcg/ml	Отклик, % Response, %	Среднее значение отклика, % Average response value, %
80	8,00	7,94	99,31	99,95
	8,00	7,98	99,75	
	8,00	8,06	100,78	
100	10,00	10,02	100,20	100,14
	10,00	9,98	99,78	
	10,00	10,04	100,44	
120	12,00	11,91	99,24	100,12
	12,00	11,99	99,88	
	12,00	12,15	101,24	
Статистические характеристики Statistical characteristics			Результаты, % Results, %	Критерии приемлемости Eligibility criteria
Среднее значение Average value			100,07	95–105 %
Стандартное отклонение Standard deviation			0,66	–
Относительное стандартное отклонение Relative standard deviation			0,66	≤3,0
Верхняя граница доверительного интервала (P = 95 %) Upper bound of the confidence interval (P = 95 %)			100,58	должен включать 100 % значение must include 100 % value
Нижняя граница доверительного интервала (P = 95 %) The lower limit of the confidence interval (P = 95 %)			99,56	

Таблица 3. Валидация методики количественного определения ивермектина в полимерных микрочастицах по параметру повторяемость (сходимость)

Table 3. Validation of the method of quantitative determination of ivermectin in polymer microparticles by the repeatability (convergence) parameter

Номер пробы Sample number	Площадь пика ивермектина, mAU · мин Ivermectin peak area, mAU · min	Содержание ивермектина в полимерных микрочастицах, % The content of ivermectin in polymer microparticles, %
1	5,1244	48,90
2	5,1892	49,66
3	5,1226	48,88
4	5,1145	48,79
5	5,1591	49,31
6	5,2428	50,28
Статистические характеристики Statistical characteristics		Результаты Results
Среднее содержание, % Average content, %		49,30
Стандартное отклонение, % Standard deviation, %		0,58
Относительное стандартное отклонение, % Relative standard deviation, %		1,18
Доверительный интервал (P = 95 %), мг Confidence interval (P = 95 %), mg		±0,61

Относительное стандартное отклонение по результатам измерений в течение двух дней должно составлять не более 3,0 %. Критерий Фишера составил 1,01, что удовлетворяет предъявленным критериям. Требования критерия прецизионности по параметру внутрилабораторная прецизионность выполнены.

Полученные расчетные и экспериментальные значения, полностью удовлетворяли предъявленным критериям, что позволяет сделать заключение о корректности применения методики количественного определения ивермектина в полимерных микрочастицах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы удалось разработать методику количественного определения ивермектина в составе полимерных микрочастиц. Полученная методика отличается экспрессностью, эффективностью и простотой процедуры пробоподготовки исследуемого образца. В завершении была проведена валидация разработанной методики по параметрам специфичность, аналитическая область, линейность, повторяемость, внутрилабораторная прецизионность. Тесты выполнены в полном объеме и удовлетворяют всем предъявляемым требованиям.

На следующем этапе планируется разработка методики определения родственных примесей в образцах микрочастиц поликапролактона инкапсулированных ивермектином и изучение их стабильности.

Таблица 4. Валидация методики количественного определения ивермектина в полимерных микрокапсулах по параметру внутрилабораторная прецизионность

Table 4. Validation of the method of quantitative determination of ivermectin in polymer microparticles by the parameter intra-laboratory precision

Номер пробы Sample number	Сотрудник 1 Employee 1		Сотрудник 2 Employee 2	
	Площадь пика ивермектина, mAU · min Ivermectin peak area, mAU · min	Содержание ивермектина в полимерных микрокапсулах, % The content of ivermectin in polymer microparticles, %	Площадь пика ивермектина, mAU · min Ivermectin peak area, mAU · min	Содержание ивермектина в полимерных микрокапсулах, % The content of ivermectin in polymer microparticles, %
1	5,1244	48,90	5,2361	50,20
2	5,1892	49,66	5,2392	50,24
3	5,1226	48,88	5,1776	49,52
4	5,1145	48,79	5,1392	49,07
5	5,1591	49,31	5,2110	49,91
6	5,2428	50,28	5,2226	50,04
Статистические характеристики Statistical characteristics				
Среднее содержание, % Average content, %			49,30	49,83
Стандартное отклонение, % Standard deviation, %			0,58	0,45
Относительное стандартное отклонение, % Relative standard deviation, %			1,18	0,91
Доверительный интервал (P = 95 %), мг Confidence interval (P = 95 %), mg			0,61	0,47
F(5 %; 5;5) = 5,05			1,68	

ЛИТЕРАТУРА

- Meleny W. P. Abstract Paper: 61st Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases. Chicago: Ill, USA; 1980.
- Burg R. W., Miller B. M., Baker E. E. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1979;15(3):361–367 DOI: 10.1128/aac.15.3.361.
- Soll M. D., Carmichael I. H., Swan G. E., Scherer H. Control of cattle mange in southern africa using ivermectin. *Tropical Animal Health and Production*. 1987;19(2):93–102 DOI: 10.1007/bf02297327.
- Dorati R., Genta I., Colzani B., Tripodo G., Conti B. Preliminary investigation on the design of biodegradable microparticles for ivermectin delivery: set up of formulation parameters. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015;41(7):1182–1192. DOI: 10.3109/03639045.2014.935395.
- Lifschitz A., Virkel G., Ballent M., Sallovitz J., Imperiale F., Pis A., Lanusse C. Ivermectin (3.15%) long-acting formulations in cattle: Absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Veterinary parasitology*. 2007;147:303–310. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.04.009.
- Campbell W. C., Fisher M. H., Stapley E. O. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*. 1983;221(4613):823–828 DOI: 10.1126/science.6308762.

- Pulliam J. D., Seward R. L., Henry R. T., Steinberg S. A. Investigating ivermectin toxicity in collies. *Veterinary Medicine*. 1985;80:33–40.
- Mendes A. M., Albuquerque I. S., Machado M., Pissarra J., Meireles P., Prudencio M. Inhibition of Plasmodium liver infection by ivermectin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61:1–9. DOI: 10.1128/AAC.02005-16.
- Caly L., Druce J. D., Catton M. G., Jans D. A., Wagstaff K. M. The FDA-approved Drug Ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Research*. 2020;178:104787 DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104787.
- Arévalo A. P., Pagotto R., Pórfido J. L., Daghero H., Segovia M., Yamasaki K., Varela B., Hill M., Verdes J. M., Duhalde Vega M., Bol-lati-Fogolin M., Crispo M. Ivermectin reduces in vivo coronavirus infection in a mouse experimental model. *Scientific Reports*. 2021;11(1):7132. DOI: 10.1038/s41598-021-86679-0.
- Zaheer T., Pal K., Abbas R. Z., del Pilar Rodríguez Torres M. COVID-19 and ivermectin: Potential threats associated with human use. *Journal of Molecular Structure*. 2021;1243:130808. DOI: 10.1016/j.molstruc.2021.130808.
- Tavares E. J. M., De Araújo D. R., Fraceto, L. F. Ivermectin-loaded polymeric nanoparticles: Screening the effects of polymers, methods, and the usefulness of mathematical models. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2017;17(6):4218–4234. DOI: 10.1166/jnn.2017.13111.
- Devaka N., Rao V. Chromatographic Quantification of Ivermectin and Pranziquantel in the Tablets Using Stability Indicating RP-HPLC Method. *Pharmaceutical Sciences*. 2019;25(3):254–261. DOI: 10.1517/PS.2019.41.
- Nischal K., Somshekar B., Abhilekha P. M., Sharadamma K. C., Radhakrishna P. M. A Simple RP-HPLC Method for Estimation of Triclabendazole and Ivermectin in a Pharmaceutical Suspension Dosage Form. *Current Pharma Research*. 2011;1(4):306–310 DOI: 10.33786/JCPR.2011.V01I04.003.
- Vegad K. L., Paranjape D. B., Shah D. A., Patel E. D., Patel Y. K., Patel K. R. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of ivermectin and clorsulon in ivercam injection. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 2017;7(08):523–531.
- Dorati R., Genta I., Colzani B., Modena T., Bruni G., Tripodo G., Conti B. Stability Evaluation of Ivermectin-Loaded Biodegradable Microspheres. *AAPS PharmSciTech*. 2015;16(5):1129–1139 DOI: 10.1208/s12249-015-0305-1.
- Dorati R., Conti B., Colzani B., Dondi D., Lazzaroni S., Modena T., Genta I. Ivermectin controlled release implants based on poly-D,L-lactide and poly-ε-caprolactone. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018;4:101–110. DOI 10.1016/j.jddst.2018.04.014.
- Рыбченко О. И., Суслев В. В., Домнина Ю. М., Инкапсулирование ивермектина в микрокапсулы поликапролактона. В кн.: Научные исследования молодых ученых: сборник статей XII Международной научно-практической конференции. Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение»; 2021. С. 226–230. Доступно по: <https://naukaip.ru/wp-content/uploads/2021/06/%D0%9C%D0%9A-1137.pdf>. Ссылка активна на 09.08.2021.
- ГФ XIV ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Доступно по: <https://pharmascopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik/> Ссылка активна на 09.08.2021.

REFERENCES

- Meleny W. P. Abstract Paper: 61st Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases. Chicago: Ill, USA; 1980.
- Burg R. W., Miller B. M., Baker E. E. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1979;15(3):361–367 DOI: 10.1128/aac.15.3.361.
- Soll M. D., Carmichael I. H., Swan G. E., Scherer H. Control of cattle mange in southern africa using ivermectin. *Tropical Animal Health and Production*. 1987;19(2):93–102 DOI: 10.1007/bf02297327.

4. Dorati R., Genta I., Colzani B., Tripodo G., Conti B. Preliminary investigation on the design of biodegradable microparticles for ivermectin delivery: set up of formulation parameters. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015;41(7):1182–1192. DOI: 10.3109/03639045.2014.935395.
5. Lifschitz A., Virkel G., Ballent M., Sallovitz J., Imperiale F., Pis A., Lanusse C. Ivermectin (3.15%) long-acting formulations in cattle: Absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Veterinary parasitology*. 2007;147:303–310. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.04.009.
6. Campbell W. C., Fisher M. H., Stapley E. O. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*. 1983;221(4613):823–828 DOI: 10.1126/science.6308762.
7. Pulliam J. D., Seward R. L., Henry R. T., Steinberg S. A. Investigating ivermectin toxicity in collies. *Veterinary Medicine*. 1985;80:33–40.
8. Mendes A. M., Albuquerque I. S., Machado M., Pissarra J., Meireles P., Prudencio M. Inhibition of Plasmodium liver infection by ivermectin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61:1–9. DOI: 10.1128/AAC.02005-16.
9. Caly L., Druce J. D., Catton M. G., Jans D. A., Wagstaff K. M. The FDA-approved Drug Ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Research*. 2020;178:104787 DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104787.
10. Arévalo A. P., Pagotto R., Pórfido J. L., Daghero H., Segovia M., Yamasaki K., Varela B., Hill M., Verdes J. M., Duhalde Vega M., Bollati-Fogolin M., Crispo M. Ivermectin reduces in vivo coronavirus infection in a mouse experimental model. *Scientific Reports*. 2021;11(1):7132. DOI: 10.1038/s41598-021-86679-0.
11. Zaheer T., Pal K., Abbas R. Z., del Pilar Rodríguez Torres M. COVID-19 and ivermectin: Potential threats associated with human use. *Journal of Molecular Structure*. 2021;1243:130808. DOI: 10.1016/j.molstruc.2021.130808.
12. Tavares E. J. M., De Araújo D. R., Fraceto, L. F. Ivermectin-loaded polymeric nanoparticles: Screening the effects of polymers, methods, and the usefulness of mathematical models. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2017;17(6):4218–4234. DOI: 10.1166/jnn.2017.13111.
13. Devaka N., Rao V. Chromatographic Quantification of Ivermectin and Pranziquantel in the Tablets Using Stability Indicating RP-HPLC Method. *Pharmaceutical Sciences*. 2019;25(3):254–261. DOI: 10.15171/PS.2019.41.
14. Nischal K., Somshekar B., Abhilekha P. M., Sharadamma K. C., Radhakrishna P. M. A Simple RP-HPLC Method for Estimation of Triclabendazole and Ivermectin in a Pharmaceutical Suspension Dosage Form. *Current Pharma Research*. 2011;1(4):306–310 DOI: 10.33786/JCPR.2011.V01I04.003.
15. Vegad K. L., Paranjape D. B., Shah D. A., Patel E. D., Patel Y. K., Patel K. R. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of ivermectin and clorsulon in ivercam injection. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 2017;7(08):523–531.
16. Dorati R., Genta I., Colzani B., Modena T., Bruni G., Tripodo G., Conti B. Stability Evaluation of Ivermectin-Loaded Biodegradable Microspheres. *AAPS PharmSciTech*. 2015;16(5):1129–1139 DOI: 10.1208/s12249-015-0305-1.
17. Dorati R., Conti B., Colzani B., Dondi D., Lazzaroni S., Modena T., Genta I. Ivermectin controlled release implants based on poly-D,L-lactide and poly-ε-caprolactone. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018;4:101–110. DOI 10.1016/j.jddst.2018.04.014.
18. Rybchenko O. I., Suslov V. V., Domnina Yu. M., Encapsulation of ivermectin in polycaprolactone microparticles. In: Scientific research of young scientists: collection of the XII International Scientific and Practical Conference. Penza: MTsNS «Nauka i Prosveshchenie»; 2021. P. 226–230. Available at: <https://naukaip.ru/wp-content/uploads/2021/06/%D0%9C%D0%9A-1137.pdf>. Accessed: 09.08.2021. (In Russ.)
19. GF XIV OFS.1.1.0012.15. Validatsiya analiticheskikh metodik [GF XIV OFS.1.1.0012.15 Validation of analytical methods]. Available at: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik/> Accessed: 09.08.2021. (In Russ.)

Крупнейшая в Сибири международная выставка
оборудования, сырья и услуг для производства
фармацевтических препаратов и форум для
специалистов фармацевтической отрасли.

ТЕХНО ФАРМ С И Б И Р Ь

17-18 марта 2022 г.

**NOVOSIBIRSK
EXPO CENTRE**

Организатор: ООО ТехноФарм www.techno-farm.com



📱 @tehnopharm_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)



Для бесплатного посещения выставки, пожалуйста, заполните форму на сайте.

Ждём Вас на выставке!

www.technopharm-siberia.com

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-99-105>
УДК 615.071



Оригинальная статья / Research article

Растровая электронная микроскопия в анализе видов рода *Persicaria* Mill.

А. А. Гудкова¹, А. С. Чистякова¹, Д. А. Синецкая¹, А. И. Сливкин¹, А. С. Болгов¹, М. А. Болгова²

¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»), 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

² Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение средняя общеобразовательная школа № 9 (МБОУ СОШ №9), 394030, Россия, г. Воронеж, ул. Карла Маркса, д. 69

* Контактное лицо: Гудкова Алевтина Алексеевна. E-mail: al.f84@mail.ru

ORCID: А. А. Гудкова – <https://orcid.org/0000-0002-1275-5000>; А. С. Чистякова – <https://orcid.org/0000-0002-8291-9904>; Д. А. Синецкая – <https://orcid.org/0000-0002-5911-9474>; А. И. Сливкин – <https://orcid.org/0000-0002-7811-8354>; А. С. Болгов – <https://orcid.org/0000-0001-5827-5953>; М. А. Болгова – <https://orcid.org/0000-0002-3088-8296>.

Статья поступила: 07.09.2021

Статья принята в печать: 00.01.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Растровая электронная микроскопия это современный и перспективный метод анализа, с помощью которого становится возможным описать идентификационные признаки растений, относящихся к одному роду и имеющих сходные морфологические признаки, а также провести микрорентгенструктурный анализ образца в выделенной области с высокой точностью. Метод используется для изучения морфологии поверхности и экспресс определения состава элементов в различных сферах однако, применение метода растровой электронной микроскопии для анализа растительного сырья в фармации ограничено.

Цель. Целью исследования являлось изучение видов рода *Persicaria* Mill. с помощью метода растровой электронной микроскопии.

Материалы и методы. Для проведения исследования в качестве объектов выступали горец почечуйный (*Persicaria maculosa* S.F. Gray), горец перечный (*Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre) и близкие к ним горец войлочный (*Persicaria tomentosa* (Schrank) E.P. Bicknell) и горец малый (*Persicaria minor* (Huds.) Opiz) соответственно, а также двух форм горца земноводного [водной (ВФ) и наземной (НФ)] (*Persicaria amphibia* (L.) Delarbre, *Persicaria amphibia* var. *terrestris* (Leyss.) Munshi & Javeid), заготовленные во время цветения в Воронежской области. Анализ проводили на электронном микроскопе JSM-6510LV (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»).

Результаты и обсуждение. Исследованы морфолого – анатомические признаки листовых пластинок шести видов рода горец с помощью растровой электронной микроскопии и выявлены новые диагностические признаки. В результате микрорентгенструктурного анализа в объектах исследования установлено содержание некоторых элементов (калия, кальция и магния).

Заключение. Впервые проведено исследование морфологии поверхности листовых пластин некоторых представителей рода *Persicaria* Mill. методом растровой электронной микроскопии. Проведено уточнение особенностей строения устьичного аппарата, трихом и выделительного аппарата на листьях исследуемых видов горцев. С помощью микрорентгенструктурного анализа установлено, что магний является одним из главных минеральных составляющих для листьев горца малого, калия – для листьев горца почечуйного, а кальция – для листьев горца перечного.

Ключевые слова: *Persicaria* Mill., растровая электронная микроскопия, морфология поверхности листа, идентификация, микрорентгенструктурный анализ

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. А. Гудкова и А. И. Сливкин отвечали за организационную часть исследования, осуществляли планирование эксперимента, постановку целей и задач исследования, участвовали в обсуждении полученных результатов. Д. А. Синецкая оказывала помощь и консультации при работе на растровом электронном микроскопе, осуществляла пробоподготовку объектов. А. С. Чистякова и А. С. Болгов участвовали в заготовке объектов исследования, их идентификации, приведении в стандартное состояние и подготовке к исследованию. М. А. Болгова выполнила проверку и корректировку конечной версии рукописи и перевод. Все авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в формате научной дискуссии.

Для цитирования: Гудкова А. А., Чистякова А. С., Синецкая Д. А., Сливкин А. И., Болгов А. С., Болгова М. А. Растровая электронная микроскопия в анализе видов рода *Persicaria* Mill. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):99–105. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-99-105>

Scanning Electron Microscopy in the Analysis of Species of the Genus *Persicaria* Mill.

Alevtina A. Gudkova^{1*}, Anna S. Chistyakova¹, Daria A. Sinetskaya¹, Alexey I. Slivkin¹, Alexey S. Bolgov¹, Marina A. Bolgova²

¹ Voronezh State University, 1, Universitetskaja Square, Voronezh, 394018, Russia

² Municipal budgetary general education institution secondary general school No. 9, 69, Karla Marksa str., Voronezh, 394030, Russia

*Corresponding author: Alevtina A. Gudkova. E-mail: al.f84@mail.ru

ORCID: Alevtina A. Gudkova – <https://orcid.org/0000-0002-1275-5000>; Anna S. Chistyakova – <https://orcid.org/0000-0002-8291-9904>;

Daria A. Sinetskaya – <https://orcid.org/0000-0002-5911-9474>; Alexey I. Slivkin – <https://orcid.org/0000-0002-7811-8354>; Alexey S. Bolgov – <https://orcid.org/0000-0001-5827-5953>;

Marina A. Bolgova – <https://orcid.org/0000-0002-3088-8296>.

Received: 07.09.2021

Revised: 00.01.2022

Published: 25.02.2022

© Гудкова А. А., Чистякова А. С., Синецкая Д. А., Сливкин А. И., Болгов А. С., Болгова М. А., 2022

© Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Sinetskaya D. A., Slivkin A. I., Bolgov A. S., Bolgova M. A., 2022

Abstract

Introduction. Scanning electron microscopy acts as a promising method of analysis, allowing to describe in detail the identification features of closely related plant species, as well as to conduct micro-roentgenstructural analysis of the sample in the selected area with high accuracy. The method is used to study the morphology of the surface and express determination of the composition of elements in various fields (physics, materials science, medicine, however, the use of the method of scanning/raster electron microscopy for the analysis of plant raw materials in pharmacy is limited).

Aim. The purpose of the study was to study species of the genus *Persicaria* Mill. using scanning electron microscopy.

Materials and methods. The objects of study were the *Persicaria maculosa* S.F. Gray, *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre, *Persicaria tomentosa* (Schränk) E.P. Bicknell, *Persicaria minor* (Huds.) Opiz, *Persicaria amphibia* (L.) Delarbre, *Persicaria amphibia* var. *terrestris* (Leyss.) Munshi & Javeid, harvested during flowering in the Voronezh region. The study of samples by scanning electron microscopy was carried out on an electron microscope JSM-6510LV (Center for Collective Use of Voronezh State University).

Results and discussion. With the help of scanning electron microscopy, morphological and anatomical signs of leaf plates of six species of the genus *Persicaria* were investigated and new diagnostic signs were identified. As a result of micro-X-RAY analysis, the content of some elements (potassium, calcium and magnesium) was established in the objects of study.

Conclusion. For the first time to analyze the surface morphology of the leaf plate of species of the genus *Persicaria* Mill. the method of scanning electron microscopy is used. The features of the stomatal apparatus, trichomes and glands on the leaves of the studied species of *Persicaria* are clarified. With the help of micro-roentgenstructural analysis it was found, that a greater amount of magnesium is typical for the leaves of *Persicaria minor*, calcium – for the leaves of *Persicaria hydropiper*, and potassium – for the leaves of *Persicaria maculosa*.

Keywords: *Persicaria* Mill., scanning electron microscopy, leaf surface morphology, identification, micro-roentgenstructural analysis

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Alevtina A. Gudkova and Alexey I. Slivkin were responsible for the organizational part of the study, carried out planning, setting goals and objectives of the study, participated in the discussion of the results obtained. Daria A. Sinetskaya provided assistance and advice when working on a scanning electron microscope, carried out sample preparation of objects. Anna S. Chistyakova, Alexey S. Bolgov participated in the collecting of research objects, their identification and preparation for research. Marina A. Bolgova checked and corrected the final version of the content and translated it. All authors participated in the discussion of the results obtained in the format of a scientific discussion.

For citation: Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Sinetskaya D. A., Slivkin A. I., Bolgov A. S., Bolgova M. A. Scanning electron microscopy in the analysis of species of the genus *Persicaria* Mill. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):99–105. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-99-105>

ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений современной фармакогностической науки является изучение применимости различных методов анализа из смежных областей. К подобным методам относится растровая электронная микроскопия (РЭМ), используемая, чаще всего, в физике, металлургии для исследования микроструктуры поверхности образца. Преимуществами РЭМ перед оптической микроскопией является повышение четкости изображения, глубины резкости, отсутствие пробоподготовки, негативно влияющей на микродиагностические структуры, а также возможность проведения микрорентгенструктурного анализа [1, 2]. Метод РЭМ все чаще находит применение в медицине и фармации, информация по использованию РЭМ к анализу растительного сырья на настоящий момент ограничена [3–18]. Использование подобных высокоточных и прогрессивных методов микроскопического анализа особенно актуально для изучения близкородственных видов растений, характеризующихся сходными морфологическими и анатомическими признаками, так как становится возможным установить дополнительные анатомические особенности или уточнить уже известные признаки. К роду растений, для видов которого важно выявление дополнительных морфолого-анатомических особен-

ностей, относится род горец *Persicaria* Mill., семейства гречишные *Polygonaceae* Juss., включающий более 300 видов, многие из них, зачастую имеют сходные идентификационные характеристики, произрастают в одних экологических сообществах, образуя смешанные заросли [19, 20]. В Государственную Фармакопею РФ XIV включены два вида рода горец, заготавливаемой частью которых является трава, горец почечуйный и горец перечный [21], обладающие кровоостанавливающей активностью, в народной медицине используются и другие виды (горец щавелелистный, горец малый, горец земноводный и др.), которые на сегодняшний день считаются не допустимыми к заготовке, оказывающие противомикробную, фунгицидную активность [22–25].

Целью исследования являлось изучение видов рода *Persicaria* Mill. с помощью растровой электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Шесть видов рода горец (*Persicaria* Mill.) выступали в качестве объектов исследования: горец почечуйный (*Persicaria maculosa* S.F. Gray), и горец перечный (*Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre) и близкие к ним горец войлочный (*Persicaria tomentosa* (Schränk) E.P. Bicknell) и горец малый (*Persicaria minor* (Huds.)

Opiz) соответственно, а также двух формах горца земноводного [водной (ВФ) и наземной (НФ)] (*Persicaria amphibia* (L.) Delarbre, *Persicaria amphibia* var. *terrestris* (Leyss.) Munshi & Javeid.)).

Растительное сырье было заготовлено от дикорастущих представителей во время цветения в Воронежской области в 2018 году и подвергнуто воздушно – теневой сушке. Видовая принадлежность устанавливались с использованием гербариев кафедры ботаники и микологии ФГБОУ ВО «ВГУ».

Исследования растительных объектов методом РЭМ проводили после предварительного напыления тонкой металлической пленки золота на установке магнетронного типа с целью обеспечения проводимости. Изучение образцов (диагностические признаки и микрорентгенструктурный анализ) проводили на электронном микроскопе JSM-6510LV (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Были получены микрофотографии, где визуализированы поверхности листовых пластинок и цветков исследуемых объектов в нативном состоянии, со всеми особенностями их рельефа (рисунки 1–13). Анализ строения клеток поверхности листовой пластинки видов рода *Persicaria* Mill. методом РЭМ осложнялся образованием складок в результате высушивания образцов.

В результате изучения морфологии поверхности листовых пластинок листа *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre, *Persicaria minor* (Huds.) Opiz и *Persicaria maculosa* S.F. Gray, было выявлено, что клеточные стенки не утолщены и не кутикулизованы, поверхности листьев остальных объектов имеют выраженные утолщения клеточных стенок и покрыты плотным слоем кутикулы (рисунки 1, 2), что позволяет установить их форму (многоугольная, овальная или слегка вытянутая).

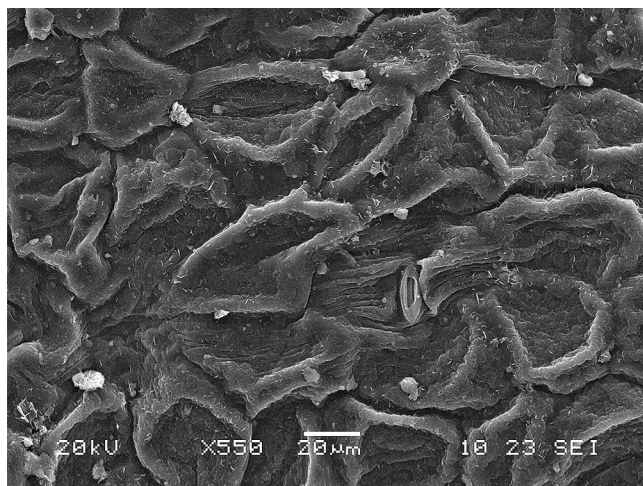


Рисунок 1. Фрагмент листовой пластинки *P. amphibia* var. *terrestris* (Leyss.) Munshi & Javeid: складчатость кутикулы и устьица

Figure 1. Fragment of a leaf blade of *P. amphibia* var. *terrestris* (Leyss.) Munshi & Javeid: folded cuticle and stomata

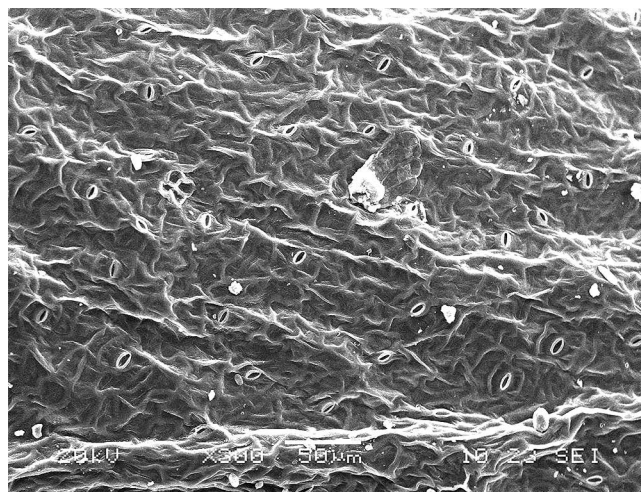


Рисунок 2. Фрагмент листовой пластинки *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre

Figure 2. Fragment of *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre leaf blade

В результате детального изучения остальных диагностических структур (выделительного и устьичного аппарата, трихом), выявлено, что при использовании РЭМ эти структуры отчетливо заметны, и легче визуализируются, чем при использовании оптической микроскопии. В результате подробного изучения «архитектуры» пучковых трихом выявлено, что клетки, их составляющие у всех изучаемых видов растений имеют вытянутые клеточные стенки с утолщениями, клетки в верхней части волоска вытянутее, чем при основании. Около места прикрепления трихом клетки эпидермиса образуют розетку (рисунки 3–6). Установлены различия в строении устьичного аппарата изучаемых растений. *P. maculosa* имеет устьица овальной формы, стенки замыкающих клеток имеют выраженные утолщения, а также выявлено наличие «тяжей», идущих от клеток эпидермиса листовой пластинки к замыкающим клеткам устьиц. Устьич-

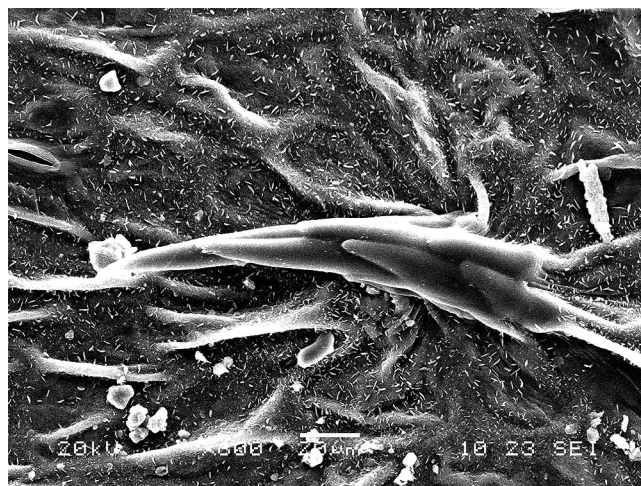


Рисунок 3. Фрагмент листовой пластинки *P. maculosa* с пучковым волоском

Figure 3. Fragment of a leaf blade of *P. maculosa* with a bundle hair

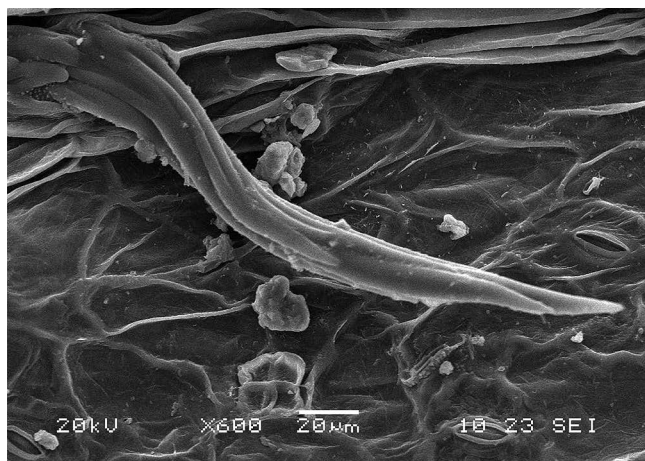


Рисунок 4. Фрагмент листовой пластинки *Persicaria minor* (Huds.) Opiz с пучковым волоском

Figure 4. Fragment of a leaf blade of *Persicaria minor* (Huds.) Opiz with a bundle hair

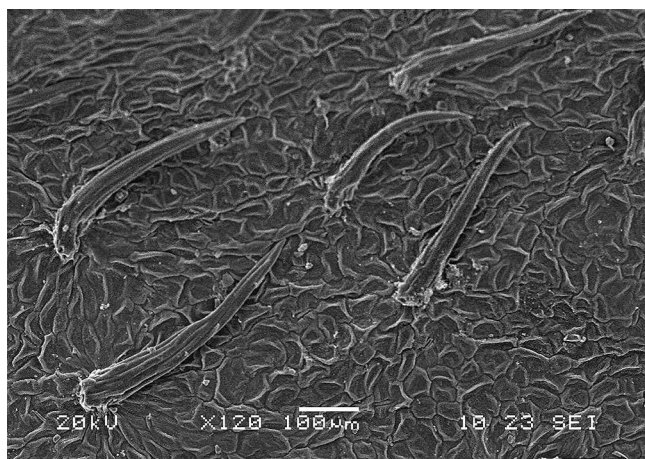


Рисунок 5. Фрагмент листовой пластинки *Persicaria amphibia* var. *terrestris* (Leyss.) Munshi & Javeid с пучковым волоском

Figure 5. Fragment of a leaf blade of *Persicaria amphibia* var. *terrestris* (Leyss.) Munshi & Javeid with a tufted hair

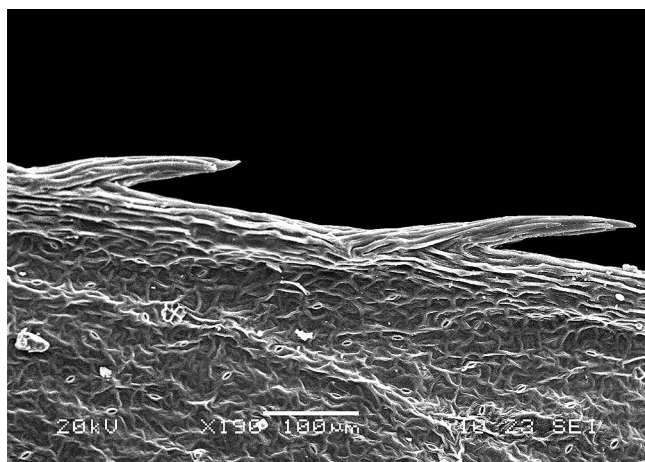


Рисунок 6. Фрагмент листовой пластинки *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre с пучковым волоском

Figure 6. Fragment of *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre leaf blade with tufted hair

ный аппарат *Persicaria tomentosa* (Schrank) E.P. Bicknell сильно выступает над поверхностью листа, замыкающие клетки выпуклые, кутикулизованные. Устьичные щели *Persicaria amphibia* (L.) Delarbre сильно открыты (рисунки 7–8). Выявлено наличие на нижней и (реже) верхней поверхности листа *Persicaria minor* (Huds.) Opiz крупных многоклеточных железок и мест их прикрепления в виде полых образований из четырех клеток с утолщенными стенками. Аналогичные структуры наблюдаются на листовой пластинке *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre (рисунки 9–10).

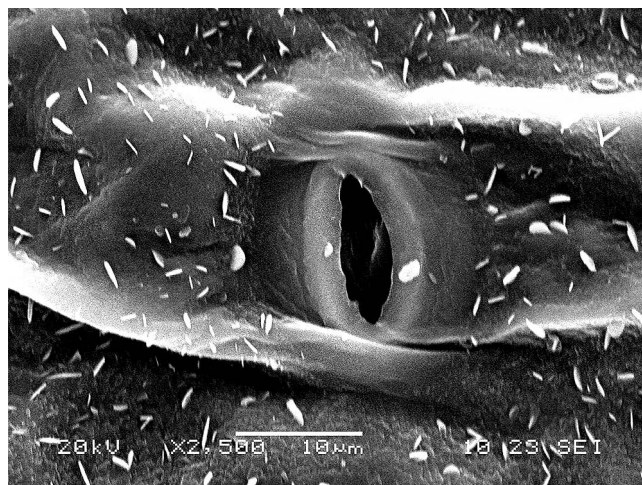


Рисунок 7. Фрагмент листовой пластинки *P. maculosa*

Figure 7. Fragment of a leaf blade of *P. maculosa*

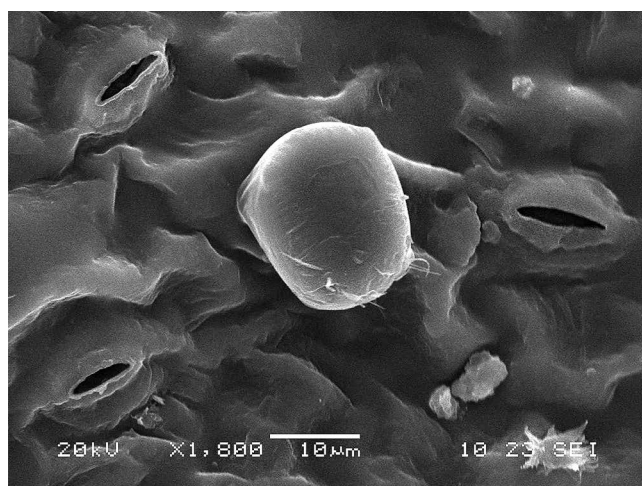


Рисунок 8. Фрагмент листовой пластинки *Persicaria tomentosa* (Schrank) E.P. Bicknell

Figure 8. Fragment of a leaf blade of *Persicaria tomentosa* (Schrank) E.P. Bicknell

Анализ морфологии поверхности околоцветника методом РЭМ проводили на примере цветка *P. maculosa*. Эпидермис венчика имеет сильно вытянутые клетки с продольными извилистыми складками. Трихомы редкие, пучкового строения. Выявлено наличие редко встречающихся многоклеточных овальной формы железок на поверхности околоцветника

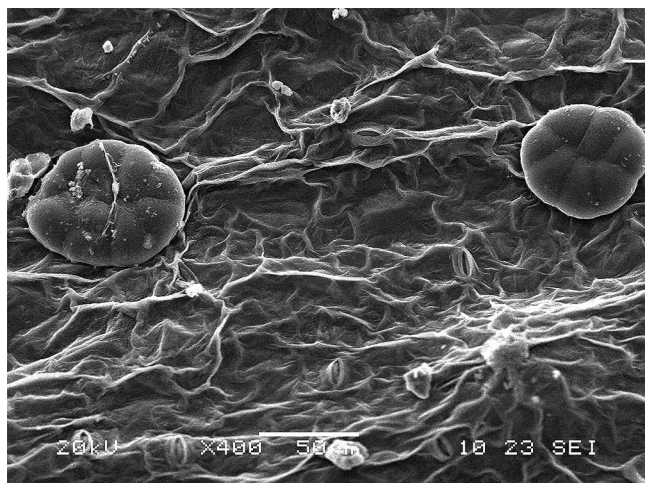


Рисунок 9. Фрагмент листовой пластинки *Persicaria minor* (Huds.) Opiz (выделительный аппарат)

Figure 9. Fragment of a leaf blade of *Persicaria minor* (Huds.) Opiz (excretory apparatus)

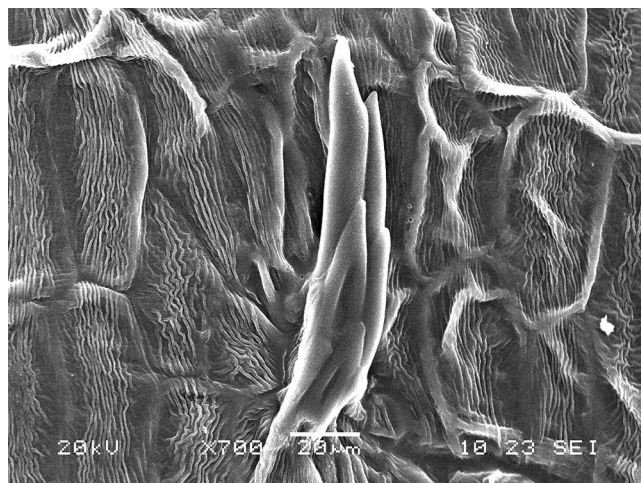


Рисунок 11. Пучковый волосок цветка *P. maculosa*

Paint 11. Tufted hair of *P. maculosa* flower

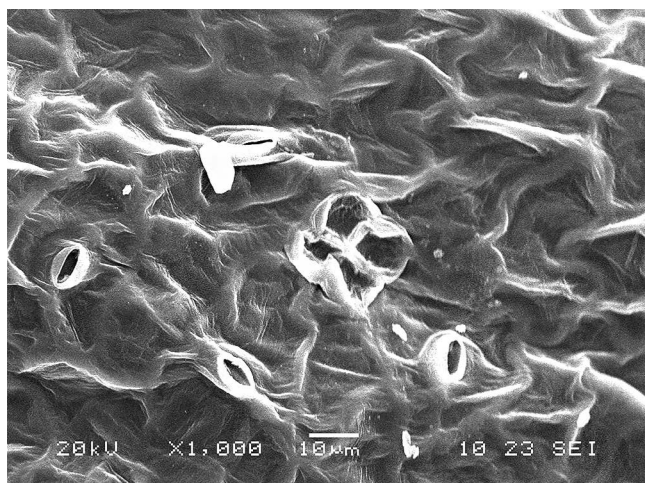


Рисунок 10. Фрагмент листовой пластинки *Persicaria minor* (Huds.) Opiz (устьица и место прикрепления железистого волоска)

Figure 10. Fragment of a leaf blade of *Persicaria minor* (Huds.) Opiz (stomata and place of attachment of the glandular hair)

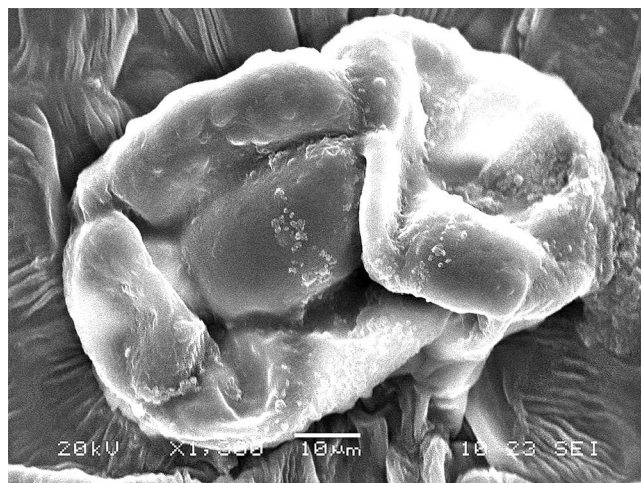


Рисунок 12. Железка цветка *P. maculosa*

Paint 12. *P. maculosa* flower gland

на короткой ножке (рисунки 11–12). Подобные структуры характерны для всех объектов исследования (рисунок 13).

В результате проведения микрорентгенструктурного анализа, были получены рентгеновские спектры, позволяющие установить наличие определенных элементов в выделенном участке при анализе образцов методом РЭМ. Данные о количественном содержании элементов в листьях изучаемых видов растений приведены в таблице 1.

Данные таблицы 1 показывают, что, учитывая органическую природу изучаемых образцов, наибольшую долю в составе элементов занимают углерод и кислород. Ведущим элементом для листа *Persicaria maculosa* является калий, которого в листьях *Persicaria amphibia* var. *terrestris* (Leyss.) Munshi & Javeid, *Persicaria minor* (Huds.) Opiz и *Persicaria hydropiper* (L.) De-

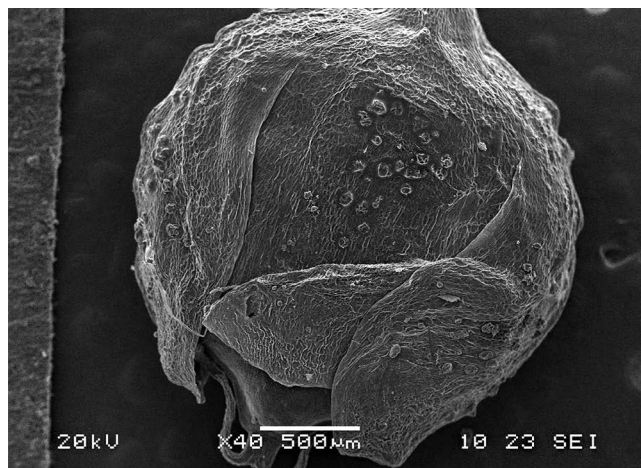


Рисунок 13. Форма и морфология поверхности околоцветника *Persicaria tomentosa* (Schrank) E.P. Bicknell

Paint 13. The shape and morphology of the perianth surface of *Persicaria tomentosa* (Schrank) E.P. Bicknell

Таблица 1. Содержание элементов листа видов рода *Persicaria* Mill.

Table 1. Contents of leaf elements in species of the genus *Persicaria* Mill.

Элемент The elements	Содержание элементов, % The content of the elements, %											
	<i>Persicaria maculosa</i> S.F. Gray		<i>Persicaria tomentosa</i> (Schrank) E.P. Bicknell		<i>Persicaria amphibia</i> (L.) Delarbre		<i>Persicaria amphibia</i> var. <i>terrestris</i> (Leyss.) Munshi & Javeid		<i>Persicaria minor</i> (Huds.) Opiz		<i>Persicaria hydropiper</i> (L.) Delarbre	
	Вес Weight	Атом Atomic	Вес Weight	Атом Atomic	Вес Weight	Атом Atomic	Вес Weight	Атом Atomic	Вес Weight	Атом Atomic	Вес Weight	Атом Atomic
C	33,8	42,8	46,4	55,0	46,2	54,6	48,4	57,2	29,9	38,6	16,5	22,2
O	54,6	51,9	47,2	42,0	48,8	43,3	45,1	40,0	57,1	55,3	72,1	72,7
Mg	2,7	1,7	2,8	1,6	1,2	0,7	1,9	1,1	3,9	2,5	1,7	1,2
K	7,7	3,0	2,5	0,9	2,3	0,8	3,3	1,2	5,8	2,3	5,8	2,4
Ca	1,1	0,4	1,2	0,4	1,5	0,5	1,2	0,4	3,2	1,2	3,7	1,5

larbre в 2 раза меньше, чем в *P. maculosa*, а в *Persicaria tomentosa* (Schrank) E.P. Bicknell и *Persicaria amphibia* (L.) Delarbre наименьшее из всех объектов (0,8 и 0,9 атом. %, соответственно). Наибольшее содержание магния необходимо отметить в *Persicaria minor* (Huds.) Opiz (2,5 атом. %), в остальных объектах количество магния примерно одинаково (1,2–1,7 атом. %), наименьшее наблюдается в траве *Persicaria amphibia* (L.) Delarbre (0,7 атом. %). Большее содержание кальция характерно для *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre и *Persicaria minor* (Huds.) Opiz (1,5 и 1,2 атом. % соответственно), для остальных видов его количество сходно и составляет около 0,5 атом. %.

Проводя сравнение полученных результатов с данными хроматомасспектрометрического анализа (для *P. maculosa*, *Persicaria tomentosa* (Schrank) E.P. Bicknell, *Persicaria minor* (Huds.) Opiz и *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre), нужно отметить расхождение значений [26]. Так, согласно исследованиям, калий в большем количестве характерен для *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre (3142 мг/кг), а кальций для *Persicaria tomentosa* (Schrank) E.P. Bicknell (20847 мг/кг). Магний в большем количестве содержится в *Persicaria minor* (Huds.) Opiz (10987 мг/кг), что коррелирует с данными РЭМ.

Таким образом, метод РЭМ является перспективным для исследования морфологии растительных объектов, что актуально для проведения скринингового анализа подлинности и установления видовой принадлежности растения, особенно, учитывая наличие широкого спектра близкородственных видов. Возможность метода РЭМ, одновременно с микроскопическим анализом, определить элементный состав, включая обширный спектр элементов (в т. ч. и тяжелых металлов), и отсутствие многоуровневой пробоподготовки, позволяет использовать данный метод в фармацевтическом анализе, в качестве экспрессного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые использован метод РЭМ для анализа морфологии поверхности листовой пластинки видов рода *Persicaria* Mill. Уточнены особенности устьичного аппарата, трихом и железок на листьях

P. maculosa, *Persicaria tomentosa* (Schrank) E.P. Bicknell, двух формах земноводного, *Persicaria minor* (Huds.) Opiz и *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre. Методом РЭМ установлено содержание некоторых элементов в растительном сырье. Больше количество магния характерно для *Persicaria minor* (Huds.) Opiz, кальция – для *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre, а калия – для *P. maculosa*.

ЛИТЕРАТУРА

- Агапов Б. Л., Куликова Т. В. Растровая электронная микроскопия. Воронеж: Издательский дом ВГУ; 2018. 28 с.
- Гудкова А. А., Чистякова А. С., Сорокина А. А., Кузнецов А. Ю., Хромых Е. Г. Идентификация представителей рода *Persicaria* Mill. по морфологическим признакам. *Фармация*. 2019;68(1):10–19.
- Камалова Ю. Б. Разработка алгоритма распознавания изображений зерен пыльцы, полученных с помощью растрового электронного микроскопа, и статистический анализ их информативных параметров. *Вестник ИжГТУ*. 2014;62(2):115–117.
- Dart P. J. Scanning Electron Microscopy of Plant Roots. *Journal of Experimental Botany*. 1976;70(22):163–168.
- Kim S.-J., Kremer R. J. Scanning and transmission electron microscopy of root colonization of morningglory (*Ipomoea* spp.) seedlings by rhizobacteria. *SYMBIOSIS*. 2005;39(3):117–124.
- Talbot M. J., White R. G. Methanol fixation of plant tissue for Scanning Electron Microscopy improves preservation of tissue morphology and dimensions. *Talbot and White Plant Methods*. 2013;36(9).
- Sato T., Kwon O. Ch., Miyake H., Taniguchi T., Maeda E. Optical Microscopy and Scanning Electron Microscopy on the Surface of Rice Callus after Treatment with Cell Wall Degrading Enzymes. *Plant Prod. Sci.* 2001;4(2):145–150.
- Филонов А., Яминский И. Обработка и анализ данных в сканирующей зондовой микроскопии: алгоритмы и методы. *Наноиндустрия*. 2007;2:32–34.
- Широкова А. Г., Пасечник Л. А., Борисов С. В., Яценко С. П. Электронная микроскопия для изучения микрокапсулированных объектов. *Аналитика и контроль*. 2010;14(2):95–99.
- Бессуднова Н. О., Биленко Д. И., Вениг С. Б., Аткин В. С., Галушка В. В., Захаревич А. М. Экспериментальное исследование кристаллических образований, обнаруженных на поверхности дентина, методами растровой электронной микроскопии. *Молекулярная медицина*. 2012;5:1–7.
- Сирота Е. А., Кранина Н. А., Васильева В. И., Малыхин М. Д., Семенов В. Ф. Разработка и экспериментальная апробация программного комплекса для определения доли ионопроницающей поверхности гетерогенных мембран по данным растровой электронной микроскопии *Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация*. 2011;2:53–59.
- Павлова Л. А., Щоголев А. И., Павлова Т. В., Нестеров А. В. Инновации в применении наноструктурных методов для изучения регенерации. *Научные ведомости, серия: Медицина. Фармация*. 2012;135(16):104–107.

13. Бондарев А. В., Жиликова Е. Т., Демина Н. Б., Новиков В. Ю. Исследование морфологии сорбционных веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;(2):33–37. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-33-37.
14. Смирнова М. В., Петров А. Ю., Емельянова И. В. Изучение особенностей тонкой структуры лекарственного средства Тизоль геля. *Бутлеровские сообщения*. 2012;31(7):52–54.
15. Белаева Я. В. Особенности строения листовой пластинки видов рода *Begonia* L. (BEGONIACEAE C. AGARDH) в условиях интродукции. *Young Scientist*. 2016;35(8):131–135.
16. Олонова М. В., Мезина Н. С., Хисориев Х. Х. Строение стеблевой эпидермы *Poa relaxa* Ovcz. (Roaceae) и возможность использования ее признаков в систематике. *Систематические заметки по материалам Гербария им. П. Н. Крылова Томского государственного университета*. 2013;108:29–36.
17. Зеер Г. М., Фоменко О. Ю., Ледяева О. Н. Применение сканирующей электронной микроскопии в решении актуальных проблем материаловедения. *Journal of Siberian Federal University. Chemistry*. 2009;4:287–293.
18. Поляков В. В., Неймарк А. И., Устинов Г. Г., Петрухно Е. В. Исследование элементного состава различных видов биоминеральных образований в организме человека. *Известия Алтайского государственного университета*. 2010;65(1–1)(65):151–157.
19. Высочина Г. И. Фенольные соединения в систематике и филогении семейства гречишные (Polygonaceae juss.). Сообщение. III. Род горец – *Persicaria* Mill. *Turczaninowia*. 2008;11:129–137.
20. Маевский П. Ф. Флора средней полосы европейской части России. 11-е испр. и доп. изд. М.: КМК; 2014. 635 с.
21. Государственная фармакопея Российской Федерации. В 4 томах. XIV изд. М. Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2018.
22. Abubakar M. A., Zulkifli R., Wan Nur Atiqah, Wan Hassan, Shariff A. H. M., Nik Ahmad Nizam Nik Malek, Zakaria Z., Ahmad F. B. Antibacterial properties of *Persicaria minor* (Huds.) ethanolic and aqueous-ethanolic leaf extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2015;5(2):50–56. DOI: 10.7324/JAPS.2015.58.58.
23. Borchardt J. R., Wyse D. L., Sheaffer C. C., Kauppi K. L., Fulcher R. G., Ehlke N. J., Biesboer D. D., Bey R. F. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2008;2(5):98–110.
24. Ozbay H., Alim A. Antimicrobial activity of some water plants from the Northeastern Anatolian of Turkey. *Molecule*. 2009;14(1):321–328.
25. Ma C. J., Kiyong L., Jeong E. J., Kim S. H., Park J., Choi Y. H., Kim Y. C., Sung S. H. Persicarin from water dropwort (*Oenanthe javanica*) protects primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity. *Phytotherapy Research*. 2010;24(6):913–918. DOI: 10.1002/ptr.3065.
26. Гудкова А. А., Чистякова А. С., Сливкин А. И., Сорокина А. А. Сравнительное изучение минерального комплекса травы горца почечуйного (*Polygonum persicaria* L.) и горца войлочного (*Persicaria tomentosa* (Schränk) E. P. Bicknell). *Микроэлементы в медицине*. 2019;20(1):35–42. DOI: 10.19112/2413-6174-2019-20-1-35-42.
5. Philonov A., Yaminskiy I. Data processing and analysis in scanning probe microscopy: algorithms and methods. *Nanoindustrialiya = Nanoindustry*. 2007;2:32–34. (In Russ.)
9. Shirokova A. G., Pasechnik L. A., Borisov S. V., Yacenko S. P. Electron microscopy for studying microencapsulated objects. *Analitika i kontrol'*. 2010;14(2):95–99. (In Russ.)
10. Bessudnova N. O., Bilenko. D. I., Venig S. B., Atkin V. S., Galushka V. V., Zaharevich A. M. Experimental study of crystalline formations found on the surface of dentin using scanning electron microscopy. *Molekulyarnaya medicina = Molecular medicine*. 2012;5:1–7. (In Russ.)
11. Sirota E. A., Kranina N. A., Vasilieva V. I., Malykhin M. D., Selemenev V. F. Development and experimental testing of a software package for determining the fraction of the ion-conducting surface of heterogeneous membranes from the data of scanning electron microscopy. *Vestnik VGU seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2011;2:53–59. (In Russ.)
12. Pavlova L. A., Schogolev A. I., Pavlova T. V., Nesterov A. V. Innovation in the Application of Nanostructured Methods to Study Regeneration. *Nauchnie vedomosti, seriya: Medicina. Pharmaciya*. 2012;135(16):104–107. (In Russ.)
13. Bondarev A. V., Zhilyakova E. T., Demina N. B., Novikov V. U. Study of the morphology of sorption substances. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;(2):33–37. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-33-37.
14. Smirnova M. V., Petrov A. U., Emelyanova I. V. Study of the features of the fine structure of the drug Tizol gel. *Butlerovskie soobshcheniya*. 2012;31(7):52–54. (In Russ.)
15. Belayeva Y. V. Features of the structure of the leaf blade of species of the genus *Begonia* L. (BEGONIACEAE C. AGARDH) under conditions of introduction. *Young scientist*. 2016; 35(8):131–135. (In Russ.)
16. Olonova M. V., Mezina N. S., Hisoriyev H. H. The structure of the stem epidermis *Poa relaxa* Ovcz. (Roaceae) and the possibility of using its features in taxonomy. *Sistematicheskie zametki po materialam Gerbariya im. P. N. Krylova Tomskogo gosudarstvennogo universiteta = Systematic notes on the materials of P. N. Krylov Herbarium of Tomsk State University*. 2013;108:29–36. (In Russ.)
17. Zeer G. M., Phomenko O. U., Ledyayeva O. N. Application of scanning electron microscopy in solving urgent problems of materials science. *Journal of Siberian Federal University. Chemistry*. 2009;4:287–293. (In Russ.)
18. Polyakov V. V., Neymark A. I., Ustinov G. G., Petrukhno E. V. Study of the elemental composition of various types of biomineral formations in the human body. *Izvestiya Altayskogo Gosudarstvennogo universiteta = Izvestiya of Altai State University*. 2010;65(1–1)(65):151–157. (In Russ.)
19. Visochina G. I. Phenolic compounds in the taxonomy and phylogeny of the buckwheat family (Polygonaceae juss.). Community III. Highlander genus – *Persicaria* Mill. *Turczaninowia*. 2008;11:129–137. (In Russ.)
20. Mayevskiy P. F. *Flora sredney polosy evropeyskoy chasti Rossii* [Flora of the middle zone of the European part of Russia]. 11th rev. and add. ed. M.: KMK; 2014. 635 p. (In Russ.)
21. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. In 4 volumes. 14th ed. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii; 2018. (In Russ.)
22. Abubakar M. A., Zulkifli R., Wan Nur Atiqah, Wan Hassan, Shariff A. H. M., Nik Ahmad Nizam Nik Malek, Zakaria Z., Ahmad F. B. Antibacterial properties of *Persicaria minor* (Huds.) ethanolic and aqueous-ethanolic leaf extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2015;5(2):50–56. DOI: 10.7324/JAPS.2015.58.58.
23. Borchardt J. R., Wyse D. L., Sheaffer C. C., Kauppi K. L., Fulcher R. G., Ehlke N. J., Biesboer D. D., Bey R. F. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2008;2(5):98–110.
24. Ozbay H., Alim A. Antimicrobial activity of some water plants from the Northeastern Anatolian of Turkey. *Molecule*. 2009;14(1):321–328.
25. Ma C. J., Kiyong L., Jeong E. J., Kim S. H., Park J., Choi Y. H., Kim Y. C., Sung S. H. Persicarin from water dropwort (*Oenanthe javanica*) protects primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity. *Phytotherapy Research*. 2010;24(6):913–918. DOI: 10.1002/ptr.3065.
26. Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Slivkin A. I., Sorokina A. A. Comparative study of the mineral complex of the grass of the knotweed (*Polygonum persicaria* L.) and the knotweed (*Persicaria tomentosa* (Schränk) E. P. Bicknell). *Microelementy v medicine = Trace elements in medicine*. 2019;20(1):35–42. (In Russ.) DOI: 10.19112/2413-6174-2019-20-1-35-42.

REFERENCES

1. Agapov B. L., Kulilova T. V. *Rastrovaya elektronnaya microscopiya* [Scannig electron microscopy]. Voronezh: Izdatelskiy dom VGU; 2018. 28 p. (In Russ.)
2. Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Sorokina A. A., Kuznetsov A. U., Khromykh E. G. Identification of representatives of the genus *Persicaria* Mill. by morphological characteristics. *Pharmaciya*. 2019;68(1):10–19. (In Russ.)
3. Kamalova U. B. Development of an algorithm for recognition of images of pollen grains obtained using a scanning electron microscope, and statistical analysis of their informative parameters. *Vestnik IzhGTU*. 2014;62(2):115–117. (In Russ.)
4. Dart P. J. Scanning Electron Microscopy of Plant Roots. *Journal of Experimental Botany*. 1976;70(22):163–168.
5. Kim S.-J., Kremer R. J. Scanning and transmission electron microscopy of root colonization of morningglory (*Ipomoea* spp.) seedlings by rhizobacteria. *SYMBIOSIS*. 2005;39(3):117–124.
6. Talbot M. J., White R. G. Methanol fixation of plant tissue for Scanning Electron Microscopy improves preservation of tissue morphology and dimensions. *Talbot and White Plant Methods*. 2013;36(9).
7. Sato T., Kwon O. Ch., Miyake H., Taniguchi T., Maeda E. Optical Microscopy and Scanning Electron Microscopy on the Surface of Rice Callus after Treatment with Cell Wall Degrading Enzymes. *Plant Prod. Sci*. 2001;4(2):145–150.

Определение примесей в перспективных антиоксидантах бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфиде и додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфиде

Т. Г. Шинко^{1*}, С. В. Терентьева¹, С. Е. Ягунов², Н. В. Кандалинцева², О. И. Просенко²,
Е. А. Ивановская¹, П. И. Пинко²

¹ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России), 630091, Россия, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52

² ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный педагогический университет» (ФГБОУ ВО «НГПУ»), 630126, Россия, г. Новосибирск, ул. Вилуйская, д. 28

*Контактное лицо: Шинко Татьяна Геннадьевна. E-mail: shinko.tatiana@yandex.ru

ORCID: Т. Г. Шинко – <https://orcid.org/0000-0001-7597-078X>; С. В. Терентьева – <https://orcid.org/0000-0003-3566-2760>; С. Е. Ягунов – <https://orcid.org/0000-0003-1274-0906>;

Н. В. Кандалинцева – <https://orcid.org/0000-0001-6022-934X>; О. И. Просенко – <https://orcid.org/0000-0001-8835-1945>; Е. А. Ивановская – <https://orcid.org/0000-0002-9338-5792>;

П. И. Пинко – <https://orcid.org/0000-0002-6045-9468>.

Статья поступила: 10.08.2021

Статья принята в печать: 24.01.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфид (Т1) и бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфид (Т2) – совместная разработка кафедры химии Новосибирского государственного педагогического университета и Новосибирского института антиоксидантов. В исследованиях и экспериментах была показана антиоксидантная, противовоспалительная, гепатопротекторная, цитопротекторная, гемореологическая активность данных веществ, что позволяет считать их перспективными лекарственными антиоксидантами. Для контроля качества при последующем производстве субстанций указанных соединений необходимо разработать параметры стандартизации и составить Проект Нормативной документации.

Цель. Разработка и валидация методик определения примесей новых перспективных биологически активных веществ Т1 и Т2.

Материалы и методы. Определение примесей проводили методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 278 нм на колонке ZORBAX SB-C18 (5 мкм, 150 × 4,6 мм) в изократическом режиме с использованием в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрил – вода 95:5 при анализе Т1 и ацетонитрила при анализе Т2.

Результаты и обсуждение. В ходе разработки методик было установлено присутствие в исследуемых образцах Т1 двух неидентифицированных примесей, содержание которых в течение срока годности не превышает 0,1 %. На хроматограмме Т2 обнаружены побочный продукт синтеза – бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]дисульфид (Т2-ДС) с установленной биологической безопасностью и пределом содержания 2,5 %, а также неидентифицированная примесь с содержанием не более 0,1 %. Проведена валидация разработанных методик ВЭЖХ по характеристикам «Специфичность», «Предел количественного определения», «Линейность», «Прецизионность», «Правильность», «Аналитическая область».

Заключение. Методики определения примесей Т1 и Т2 валидированы по указанным выше параметрам. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости: вещества и примеси четко разделяются на хроматограммах между собой; коэффициент корреляции (*r*) при определении линейности для примесей превышает 0,980; свободный член уравнений линейной зависимости статистически значимо не отличается от нуля; величина относительного стандартного отклонения (RSD%) не более 5 %; рассчитанные значения критериев Стьюдента и Фишера не превышают табличные. Разработанные методики могут применяться для контроля качества опытных образцов и в будущем при производстве субстанций исследуемых веществ.

Ключевые слова: родственные примеси, додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфид, бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфид, ВЭЖХ, валидация, стандартизация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Т. Г. Шинко, С. Е. Ягунов, Н. В. Кандалинцева, О. И. Просенко, П. И. Пинко разработали эксперимент. Т. Г. Шинко, С. В. Терентьева, Е. А. Ивановская провели валидацию методик. Все авторы участвовали в обсуждении статьи, внесли вклад в окончательную рукопись.

Для цитирования: Шинко Т. Г., Терентьева С. В., Ягунов С. Е., Кандалинцева Н. В., Просенко О. И., Ивановская Е. А., Пинко П. И. Определение примесей в перспективных антиоксидантах бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфиде и додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфиде. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):106–112. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-106-112>

Determination of Impurities in New Promising Antioxidants Bis-[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propyl]sulfide and Dodecyl(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl)sulfide

Tatiana G. Shinko^{1*}, Svetlana V. Terentyeva¹, Semen Ye. Yagunov², Natalya V. Kandalintseva²,
Olga I. Prosenko², Yelena A. Ivanovskaya¹, Pavel I. Pinko²

¹ Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny av., Novosibirsk, 630091, Russia

² Novosibirsk State Pedagogical University, 28, Vilyuyskaya str., Novosibirsk, 630126, Russia

*Corresponding author: Tatiana G. Shinko. E-mail: shinko.tatiana@yandex.ru

© Шинко Т. Г., Терентьева С. В., Ягунов С. Е., Кандалинцева Н. В., Просенко О. И., Ивановская Е. А., Пинко П. И., 2022

© Shinko T. G., Terentyeva S. V., Yagunov S. Ye., Kandalintseva N. V., Prosenko O. I., Ivanovskaya Ye. A., Pinko P. I., 2022

ORCID: Tatiana G. Shinko – <https://orcid.org/0000-0001-7597-078X>; Svetlana V. Terentyeva – <https://orcid.org/0000-0003-3566-2760>;
Semen Ye. Yagunov – <https://orcid.org/0000-0003-1274-0906>; Natalya V. Kandalintseva – <https://orcid.org/0000-0001-6022-934X>;
Olga I. Prosenko – <https://orcid.org/0000-0001-8835-1945>; Yelena A. Ivanovskaya – <https://orcid.org/0000-0002-9338-5792>; Pavel I. Pinko – <https://orcid.org/0000-0002-6045-9468>.

Received: 10.08.2021 Revised: 24.01.2022 Published: 25.02.2022

Abstract

Introduction. Dodecyl(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl)sulfide (T1) and bis-[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propyl]sulfide (T2) are the collaborative development of Novosibirsk State Pedagogical University and Novosibirsk Research Institute of Antioxidants. It was revealed in several experiments and research works that these substances have antioxidant, anti-inflammatory, hepatoprotective, cytoprotective, haemorheological activities. These facts make the objects of study promising medicinal antioxidant drugs. Consequently it's necessary for the future production quality control to have standards and analytical methods for substances analysis.

Aim. Impurities methods development and validation for the new biologically active substances T1 and T2.

Materials and methods. HPLC method with UV-detection on 278 nm was carried out for the determination of impurities in objects of study. HPLC analysis were performed on ZORBAX SB-C18 (5 µm, 150 × 4,6 mm) column with isocratic regimen and with use of the acetonitrile:water mixture (T1) or acetonitrile (T2) as a mobile phase.

Results and discussion. It was found out, that T1 has two unidentified impurities with concentration not more than 0,1 % during the shelf life. The chromatogram of T2 has a peak of by-product of synthesis T2 – bis-[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propyl]disulfide (T2-DS). Biologically safety of T2-DS was demonstrated in the previous works and the concentration of T2-DS was established to be not more, than 2,5 %. Furthermore, there was the one more unidentified impurity with concentration less, than 0,1 % on the chromatogram of T2. The developed HPLC methods were validated on characteristics «specificity», «linearity», «precision», «limit of quantification», «accuracy», «range».

Conclusion. Methods for the determination of impurities in T1 and T2 were validated on the listed parameters. All the results meet the acceptance criteria: peaks on the chromatograms are clearly separated; the correlation coefficients (*r*) are not more, than 0,980; accuracy was proved by linearity parameters; the value of the relative standard deviation is less, than 5 %; the intermediate precision for the both methods was proved by Fisher's criterion and Student's t-test.

Keywords: impurities, dodecyl(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl)sulfide, bis-[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propyl]sulfide, HPLC, validation, standardization

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Tatiana G. Shinko, Semen Ye. Yagunov, Natalya V. Kandalintseva, Olga I. Prosenko and Pavel I. Pinko designed the experiment. Tatiana G. Shinko, Svetlana V. Terentyeva and Yelena A. Ivanovskaya – performed methods validation. All authors participated in the discussion of the article and contributed to the final text of the article.

For citation: Shinko T. G., Terentyeva S. V., Yagunov S. Ye., Kandalintseva N. V., Prosenko O. I., Ivanovskaya Ye. A., Pinko P. I. Determination of impurities in new promising antioxidants bis-[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propyl]sulfide and dodecyl(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl)sulfide. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):106–112. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-106-112>

ВВЕДЕНИЕ

Додецил(3,5-диметил-4-гидроксibenзил)сульфид (далее по тексту – T1) и бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфид (далее по тексту – T2) (рисунок 1) – полифункциональные фенольные серо-содержащие антиоксиданты, являющиеся совместной разработкой кафедры химии Новосибирского государственного педагогического университета и Новосибирского института антиоксидантов.

В результате исследований по установлению биологической активности указанных соединений, была выявлена антиоксидантная, противовоспалительная, гепатопротекторная, цитопротективная активность данных соединений [1–4]. Также было отмечено, что оба вещества способны усиливать противоопухолевый эффект цитостатических препаратов [5, 6]. Наряду с этим у T1 были определены гемореологический, антитромбоцитарный, антиагрегационный эффекты, что в совокупности обеспечивает протекторный эффект при ишемии головного мозга [3, 7]. Параллельно с биологической активностью, были исследованы

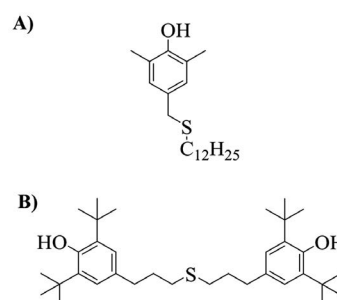


Рисунок 1. Структурные формулы додецил(3,5-диметил-4-гидроксibenзил)сульфида-T1 (A) и бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфида -T2 (B)

Figure 1. Chemical structure of dodecyl(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl)sulfide-T1 (A) and bis-[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propyl]sulfide-T2 (B)

эффективность и безопасность T1 и T2. Установлено, что описываемые вещества не оказывают токсического действия, не проявляют мутагенного и генотоксического свойств [8, 9]. Таким образом, данные соеди-

нения могут рассматриваться в качестве перспективных лекарственных препаратов-антиоксидантов с возможностью применения в комплексной терапии таких заболеваний, как гепатиты, злокачественные новообразования, атеросклероз, ишемическая болезнь.

Для регистрации и производства T1 и T2 в качестве субстанций лекарственных средств необходима, в том числе, разработка параметров стандартизации и составление Проектов Нормативных документов. Одним из показателей качества лекарственных средств является содержание родственных примесей. Поэтому целью настоящего исследования является разработка и валидация методик определения родственных примесей T1 и T2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Разработку и валидацию методик проводили на опытных образцах додецил(3,5-диметил-4-гидроксibenзил)сульфида (серия 2020-11-28) и бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензил)пропил]сульфида (серия В-501), предоставленных «Новосибирским институтом антиоксидантов».

Реактивы. В ходе работы использовались ацетонитрил для ВЭЖХ (Sigma-Aldrich, США), for HPLC >99,9 %; спирт этиловый ГОСТ Р 51652-200.

Оборудование. Определение примесей проводили на ВЭЖХ Agilent 1220 Infinity LC с УФ-детектором.

Испытуемый раствор и раствор сравнения T1. Испытуемый раствор: Около 0,500 г (точная навеска) T1 растворяют в 20 мл этанола и доводят объём этим же растворителем до 100,0 мл (5 мг/мл). Раствор сравнения: 1,0 мл испытуемого раствора доводят этанолом до 10,0 мл. 1,0 мл полученного раствора доводят тем же растворителем до 100,0 мл (5 мкг/мл).

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы (T1): 0,050 г гидрохинона помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 1 мл испытуемого раствора и 100 мл этанола, доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Испытуемый раствор и растворы сравнения А, В T2. Испытуемый раствор: Около 0,500 г (точная навеска) T2 растворяют в 5 мл ацетонитрила и доводят объём тем же растворителем до 25,0 мл. К 400,0 мкл полученного раствора прибавляют 600,0 мкл ацетонитрила (8 мг/мл). Раствор сравнения А: 1,0 мл испытуемого раствора доводят ацетонитрилом до 10,0 мл. 1,0 мл полученного раствора доводят тем же растворителем до 100,0 мл (8 мкг/мл). Раствор сравнения В: 50 мг первичного стандартного образца бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензил)пропил]дисульфида (далее по тексту – ПТ2) растворяют в 5 мл ацетонитрила и доводят объём тем же растворителем до 25,0 мл. К 100,0 мкл полученного раствора прибавляют 900,0 мкл ацетонитрила (0,2 мг/мл).

Условия хроматографирования объектов исследования методом ВЭЖХ представлены в таблице 1.

Таблица 1. Условия определения примесей T1 и T2 методом ВЭЖХ

Table 1. HPLC Conditions for determination of relative substances in T1 and T2

Параметр Parameter	Значение Value	
	T1	T2
Подвижная фаза Mobile phase	Ацетонитрил:вода 95:5 Acetonitrile:water 95:5	Ацетонитрил Acetonitrile
Колонка Column	ZORBAX SB-C18 (5 µm, 150 × 4,6 mm)	ZORBAX SB-C18 (5 µm, 150 × 4,6 mm)
Температура колонки Column temperature	40 °C	40 °C
Скорость потока Flow rate	2 мл/мин 2 ml/min	2 мл/мин 2 ml/min
Детектор Detector	УФ, 278 нм UV, 278 nm	УФ, 278 нм UV, 278 nm
Объем пробы Probe	10 мкл 10 µl	5 мкл 5 µl

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методик. Условия ВЭЖХ определения примесей в объектах исследования была подобрана в процессе разработки технологии получения T1 и T2 для контроля чистоты получаемых опытных образцов. Для детектирования выбран максимум УФ-поглощения испытуемых соединений (278 нм), являющийся также максимумом или близким к нему значением для некоторых исходных веществ и побочных продуктов синтеза. Поскольку технологическая схема получения T2 не позволяет сократить содержание основного побочного продукта – бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензил)пропил]дисульфида (далее по тексту – T2-ДС) значительно ниже 2 %, были проведены исследования его безопасности и токсичности. В результате установления безопасности указанной примеси определен верхний предел ее содержания в T2 – не более 2,5 %. Остальные примеси T1 и T2, выявляемые при хроматографировании объектов исследования, составляют не более 0,1 % и определяются согласно методикам как неидентифицированные (допустимый предел содержания неидентифицированных примесей в соответствии с ОФС.1.1.0006.15 «Фармацевтические субстанции» – не более 0,1 %, порог игнорирования – 0,05 %).

Валидация ВЭЖХ-методик определения примесей T1 и T2. Валидацию методик проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» (Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV изд.). Методики валидированы по параметрам «специфичность», «линейность», «предел количественного определения», «прецизионность», «правильность», «аналитическая область» [10–14] относительной правильности и прецизионности методик «Родственные примеси» (Relates substances).

«Специфичность» методики определяли по отсутствию пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания объектов исследова-

ния и основных примесей на хроматограммах растворителей, а также по величине разрешения ($R_s \geq 2$) между пиками на хроматограммах испытуемых растворов.

По результатам испытания на бланк-хроматограммах отсутствуют пики, соответствующие временам удерживания T1 и T2 и их основных примесей (рисунки 2, 3). Разрешение между пиками на хроматограмме T1 составило $R_{s1} = 6,35$ и $R_{s2} = 10,17$, а разрешение между пиками на хроматограмме T2 составило $R_{s1} = 2,74$ и $R_{s2} = 4,20$, что соответствует указанному критерию приемлемости.

Хроматографическая система для T1 считается пригодной при выполнении следующих условий при хроматографировании раствора для проверки пригодности хроматографической системы: величина разрешения (R_s) между пиками гидрохинона и T1 ≥ 10 ; эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику T1 не менее 5000 теоретических тарелок; фактор симметрии пика (A_s) T1 не менее 0,9 и не более 1,5; относительное стандартное отклонение (RSD%) площади пика T1 не более 2 %.

Хроматографическая система для T2 считается пригодной при выполнении следующих условий: величина разрешения (R_s) между пиками на хроматограмме ≥ 2 ; эффективность хроматографической колонки (N) не менее 1500 теоретических тарелок; фактор симметрии пика (A_s) не менее 0,8 и не более 1,5; относительное стандартное отклонение (RSD, %) площадей пиков не более 2 %. Результаты проверки пригодности хроматографических систем для T1 и T2 представлены в таблице 2.

«Линейность» методик оценивали по графику линейной зависимости (коэффициент корреляции $r \geq 0,980$) между концентрацией и площадью пиков

примесей на хроматограммах калибровочных растворов T1 и T2. Для проведения испытания были приготовлены серии калибровочных растворов с концентрацией примесей в диапазоне от порога обнаружения до 120–150 % от допустимого содержания.

Результаты валидации представлены на рисунок 4 и в таблица 2. Полученные данные удовлетворяют критерию приемлемости ($r \geq 0,980$), методики линейны в области измеряемых концентраций.

Пределы количественного определения неидентифицированных примесей, рассчитанные по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика (таблица 2) не превышают наименьших калибровочных концентраций (порог игнорирования). Фактическое отношение сигнал/шум (S/N) при хроматографировании растворов T1 и T2 в концентрациях, соответствующих 0,05 % от концентрации испытуемого раствора (порог игнорирования) составило 29,0752 и 34,829 соответственно, что соответствует критерию приемлемости ($S/N \geq 10$).

«Правильность» методик устанавливали по результатам изучения линейности. Принималось, что систематическая ошибка методики отсутствует, если свободный член (a) уравнения линейной зависимости статистически достоверно не отличается от нуля. Полученные данные удовлетворяют критерию приемлемости (таблица 2).

Прецизионность методик оценивали по параметрам «повторяемость» и «промежуточная прецизионность». Оценку повторяемости проводили на 6 образцах испытуемых растворов каждого из объектов исследования путем расчета относительного стандартного отклонения ($RSD \leq 5$ %) результатов опре-

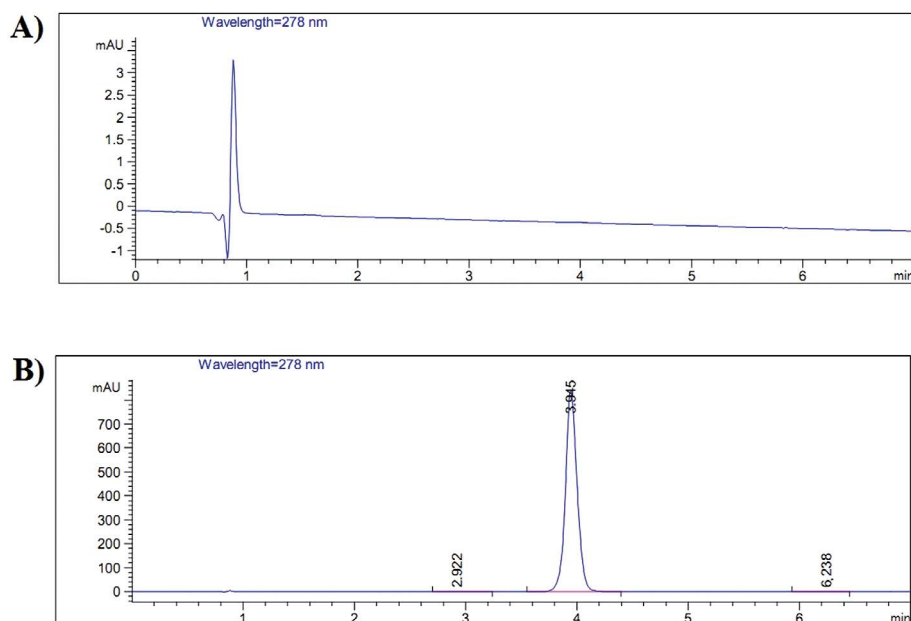


Рисунок 2. Хроматограммы растворителя (A) и испытуемого раствора (B) T1

Figure 2. Chromatograms of a solvent (A) and test solution (B) of T1

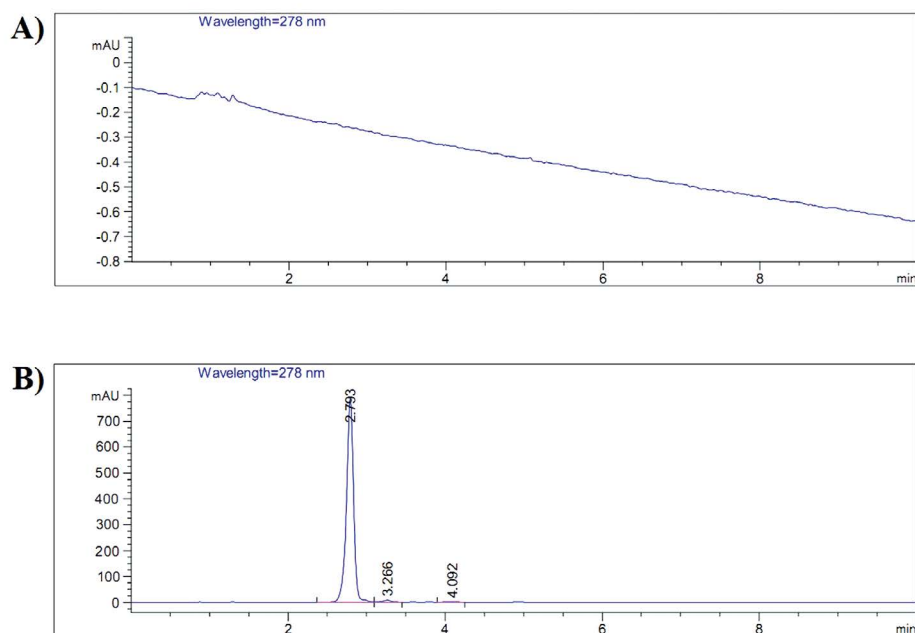


Рисунок 3. Хроматограммы растворителя (А) и испытуемого раствора (В) Т2

Figure 3. Chromatograms of a solvent (A) and test solution (B) of T2

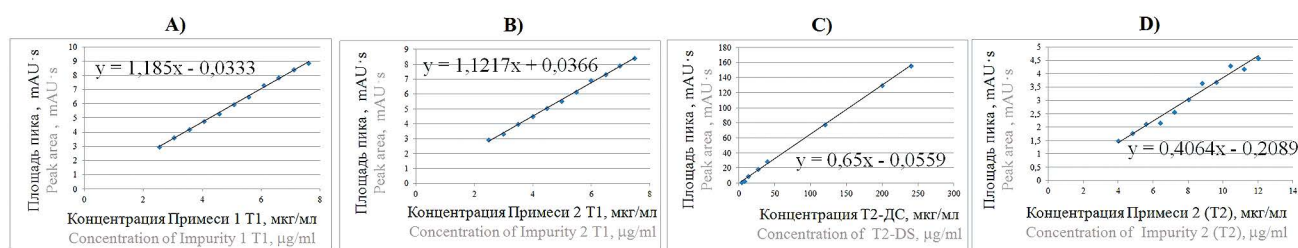


Рисунок 4. Графики и уравнения линейной зависимости площади пика на хроматограмме от концентрации:

А – Примеси 1 Т1; В – Примеси 2 Т1; С – Т2-ДС; D – Примеси 2 Т2

Figure 4. Linearity between peak area and concentration of:

А – Impurity 1 T1; В – Impurity 2 T1; С – T2-DS; D – Impurity 2 T2

деления примесей. Промежуточную прецизионность оценивали по критериям Фишера и Стьюдента, рассчитанным по значениям площадей пиков на хроматограммах, полученных в разные дни на одном оборудовании и одной серии опытных образцов Т1 и Т2. Результаты валидации (таблица 2) соответствуют критериям приемлемости.

Аналитическая область, согласно диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели, составляет 50–120 % от контролируемого предела для Примеси 1 Т1, Примеси 2 Т1 и Т2-ДС соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были разработаны и валидированы методики определения примесей в новых перспективных антиоксидантах додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфиде и бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-

гидроксифенил)пропил]сульфиде. Методики могут быть включены в Проекты Нормативных документов на указанные вещества для проведения дальнейших исследований и регистрации додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфида и бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфида в качестве лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

- Бахтина И. А., Антипова Е. В., Просенко А. Е., Стрельцова Г. П., Душкин М. И., Зенков Н. К., Меньшикова Е. Б., Рагино Ю. И. Влияние антиоксиданта «тиофан» на параметры антиокислительного стресса при ишемической болезни сердца. *Бюллетень СО РАМН*. 2000;(3–4):24–29.
- Фридлянд И. Ф., Просенко А. Е., Клепикова С. Ю., Кандалинцева Н. В., Леплина О. Ю., Тихонова М. А., Останин А. А., Черных Е. Р. Влияние антиоксидантов на функциональную активность мононуклеарных клеток периферической крови больных вирусным гепатитом С. *Медицинская иммунология*. 2001;3(2):243.

Таблица 2. Результаты валидации методик определения примесей Т1 и Т2 методом ВЭЖХ

Table 2. Results of methods validation for the HPLC determination of relative substances in T1 and T2

Параметры валидации Validation parameters	Определение примесей Т1 Determination of relative substances in T1	Определения примесей Т2 Determination of relative substances in T2
Специфичность Specificity	На хроматограмме растворителя отсутствуют пики со временами удерживания Т1 и его основных примесей; $R_{S1} = 6,35$ и $R_{S2} = 10,17$ Chromatogram of solvent has no peaks at retention time of T1 and its impurities; $R_{S1} = 6,35$ и $R_{S2} = 10,17$	На хроматограмме растворителя отсутствуют пики со временами удерживания Т2 и его основных примесей; $R_{S1} = 2,74$ и $R_{S2} = 4,20$ Chromatogram of solvent has no peaks at retention time of T2 and its impurities; $R_{S1} = 2,74$ и $R_{S2} = 4,20$
Проверка пригодности хроматографической системы System suitability	$R_s = 24,25$; $N = 5306$; $A_s = 1,077$; $RSD\% = 0,84\%$	$R_{s1} = 2,69$; $R_{s2} = 4,17$; $N_{T2} = 5465$; $N_{T2-DC} = 3854$; $N_{imp2} = 1894$; $As_{T2} = 1,27$; $As_{T2-DC} = 1,12$; $As_{imp2} = 0,89$; $RSD\%_{T2} = 0,98\%$; $RSD\%_{T2-DC} = 1,06\%$; $RSD\%_{imp2} = 1,62\%$ $R_{s1} = 2,69$; $R_{s2} = 4,17$; $N_{T2} = 5465$; $N_{T2-D5} = 3854$; $N_{imp.2} = 1894$; $As_{T2} = 1,27$; $As_{T2-D5} = 1,12$; $As_{imp.2} = 0,89$; $RSD\%_{T2} = 0,98\%$; $RSD\%_{T2-D5} = 1,06\%$; $RSD\%_{imp.2} = 1,62\%$
Линейность Linearity	$r = 0,9993$ (Примесь 1) $r = 0,9993$ (Impurity 1)	$r = 0,9997$ (Т2-ДС) $r = 0,9997$ (Т2-ДС)
	$r = 0,9992$ (Примесь 2) $r = 0,9992$ (Impurity 2)	$r = 0,9885$ (Примесь 2) $r = 0,9885$ (Impurity 2)
Прецизионность (повторяемость/промежуточная прецизионность) Precision (repeatability/intermediate precision)	$RSD = 0,98\%$ (Примесь 1) $RSD = 0,98\%$ (Impurity 1)	$F = 1,74$ $F(95\%, 5,5) = 5,05$ $t_{st} = 2,16$ $t_{st}(95\%, 10) = 2,23$
	$RSD = 1,22\%$ (Примесь 2) $RSD = 1,22\%$ (Impurity 2)	$F = 2,13$ $F(95\%, 5,5) = 5,05$ $t_{st} = 0,51$ $t_{st}(95\%, 10) = 2,23$
Правильность Accuracy	$t_a = 0,4396$ (Примесь 1) $t_{st}(95\%, 9) = 2,26$ $t_a = 0,4396$ (Impurity 1) $t_{st}(95\%, 9) = 2,26$	$t_a = 0,18$ (Т2ДС) $t_{st}(95\%, 6) = 2,45$ $t_a = 0,18$ (Т2-ДС) $t_{st}(95\%, 6) = 2,45$
	$t_a = 0,4382$ (Примесь 2) $t_{st}(95\%, 9) = 2,26$ $t_a = 0,4382$ (Impurity 2) $t_{st}(95\%, 9) = 2,26$	$t_a = 1,21$ (Примесь 2) $t_{st}(95\%, 9) = 2,26$ $t_a = 1,21$ (Impurity 2) $t_{st}(95\%, 9) = 2,26$
Предел количественного определения Limit of quantification	0,65 мкг/мл (Примесь 1) 0,65 mg/ml (Impurity 1)	12,89 мкг/мл (Т2-ДС) 12,89 mg/ml (Т2-ДС)
	0,68 мкг/мл (Примесь 2) 0,68 mg/ml (Impurity 2)	3,89 мкг/мл (Примесь 2) 3,89 mg/ml (Impurity 2)

- Плотников М. Б., Просенко А. Е., Смолякова В. И., Иванов И. С., Чернышева Г. А., Кандалинцева Н. В. Синтез и антиокислительная активность 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиододекана. *Химико-фармацевтический журнал*. 2010;44(3):65–67.
- Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Кандалинцева Н. В. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing; 2012. 488 с.
- Боровская Т. Г., Гольдберг Е. Д., Щемерова Ю. А., Пахомова А. В., Перова А. В., Просенко А. Е., Дюбенко О. И. Средство для коррекции нарушений женской репродуктивной функции, вызванных цитостатическим воздействием. Патент РФ на изобретение № 2367420 С1. 20.09.2009. Доступно по: <https://new.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=a0a3f5f82b5424e5337046838c394e0a>. Ссылка активна на 04.10.2021.
- Просенко А. Е., Гросс М. А., Кандалинцева Н. В., Толстикова Т. Г., Сорокина И. В. Средство для коррекции цитотоксических эффектов паранеопластических процессов и химиотерапии, обладающее противоопухолевой активностью. Патент РФ на изобретение № 2447888 С1. 20.04.2012. Доступно по: <https://new.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=c9dbc6a5ec333ebf1998a2e91bdc6654>. Ссылка активна на 04.10.2021.
- Плотников М. Б., Смолякова В. И., Иванов И. С., Чернышева Г. А., Просенко А. Е., Гросс М. А., Бойко М. А. Средство, обладающее антиагрегантной, уменьшающей повышенную вязкость крови и антитромбогенной активностью. Патент РФ на изобретение № 2368376 С1. 27.09.2009. Доступно по: <https://new.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=2dd769e1785fe39dfd1f744dee2cfa8>. Ссылка активна на 04.10.2021.
- Воевода Т. В., Толстикова Т. Г., Сорокина И. В. Изучение токсического действия нового фенольного антиоксиданта СО-3 в субхроническом эксперименте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2000;63(4):57–60.
- Чернышева Г. А., Гурто Р. В., Хазанов В. А., Плотников М. Б., Смолякова В. И., Просенко А. Е., Кандалинцева Н. В. Фармакокинетика тиюфана при внутривенном введении. *Химико-фармацевтический журнал*. 2010;44(4):7–11.

10. Okamoto M. Assay validation and technology transfer: Problems and solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;87:308–12. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.06.028.
11. Sahu P. K., Ramiseti N. R., Cecchi T., Swain S., Patro C. S., Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;147:590–611. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.05.006.
12. Epshtein N. A. Validation of Analytical Procedures: Graphic and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice. *Drug development and registration*. 2019;8(2):122–30. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.
13. Эпштейн Н. А., Севастьянова В. Л., Королева А. И. Валидация методик «родственные примеси» для неидентифицированных примесей. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(9):48–56. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-9-48-56.
14. Raposo F., Ibelli-Bianco C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *Trends in Analytical Chemistry*. 2020;129:115913. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115913.
8. Voevoda T. V., Tolstikova T. G., Sorokina I. V. Study of toxic effect of new phenolic antioxidant CO-3 in subchronic experiment. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2000;63(4):57–60. (In Russ.)
9. Chernysheva G. A., Gurto R. V., Khazanov, V. A., Prosenko A. E., Kandalintseva N. V. Pharmacokinetics of thiophane upon intragastric administration. *Pharmaceutical chemistry journal*. 2010;44(4):171–174. DOI: 10.1007/s11094-010-0424-7.
10. Okamoto M. Assay validation and technology transfer: Problems and solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;87:308–12. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.06.028.
11. Sahu P. K., Ramiseti N. R., Cecchi T., Swain S., Patro C. S., Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;147:590–611. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.05.006.
12. Epshtein N. A. Validation of Analytical Procedures: Graphic and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice. *Drug development and registration*. 2019;8(2):122–30. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.
13. Epshtein N. A., Sevast'yanova V. L., Koroleva A. I. Validation of Related-Substances Determination Methods for Detecting Unidentified Substances. *Pharmaceutical chemistry journal*. 2020;54(9):959–967. DOI: 10.1007/s11094-020-02303-x.
14. Raposo F., Ibelli-Bianco C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *Trends in Analytical Chemistry*. 2020;129:115913. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115913.

REFERENCES

1. Bakhtina I. A., Antip'eva E. V., Prosenko A. E., Streltsova G. P., Dushkin M. I., Zenkov N. K., Men'shchikova E. B., Ragino Yu. I. Effect of the antioxidant «thiophan» on antioxidative stress parameters in ischaemic heart disease. *Byulleten' SO RAMN*. 2000;(3–4):24–29. (In Russ.)
2. Fridlyand I. F., Prosenko A. E., Klepikova S. Yu., Kandalintseva N. V., Leplina O. Yu., Tikhonova M. A., Ostanin A. A., Chernykh E. R. Effect of antioxidants on the functional activity of peripheral blood mononuclear cells of patients with viral hepatitis C. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology*. 2001;3(2):243. (In Russ.)
3. Plotnikov M. B., Prosenko A. E., Smol'yakova V. I., Ivanov I. S., Chernysheva G. A., Kandalintseva N. V. Synthesis and antioxidant activity of 3,5-dimethyl-4-hydroxybenzylthiododecane. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical chemistry journal*. 2010;44(3):65–67. (In Russ.)
4. Men'shchikova E. B., Lankin V. Z., Kandalintseva N. V. *Fenol'nye antioksidanty v biologii i meditsine* [Phenolic antioxidants in biology and medicine]. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing; 2012. 488 p. (In Russ.)
5. Borovskaja T. G., Gol'dberg E. D., Shchemerova Ju. A., Pakhomova A. V., Perova A. V., Prosenko A. E., Djubchenko O. I. *Sredstvo dlya korrektsii narusheniy zhenskoy reproduktivnoy funktsii, vyzvannykh tsitostaticheskimi vozdeystviyami* [Means for correcting disorders of female reproductive function caused by cytostatic effect]. Patent RUS № 2367420 C1. 20.09.2009. Available at: <https://new.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=a0a3f5f82b5424e5337046838c394e0a>. Accessed: 04.10.2021. (In Russ.)
6. Prosenko A. E., Gross M. A., Kandalintseva N. V., Tolstikova T. G., Sorokina I. V. *Sredstvo dlya korrektsii tsitotoksicheskikh efektov paraneoplasticheskikh protsessov i khimioterapii, obladayushchee protivopukholevoy aktivnost'yu* [Agent for correcting cytotoxic effects of paraneoplastic processes and chemotherapy showing anticancer activity]. Patent RUS № 2447888 C1. 20.04.2012. Available at: <https://new.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=c9dbc6a5ec333ebf1998a2e91bdc6654>. Accessed: 04.10. 2021. (In Russ.)
7. Plotnikov M. B., Smol'yakova V. I., Ivanov I. S., Chernysheva G. A., Prosenko A. E., Gross M. A., Boyko M. A. *Sredstvo, obladayushchee antiagregantnoy, umen'shayushchey povyshennuyu vyazkost' krovi i antitrombogennoy aktivnost'yu* [Remedy having antiaggregant activity, activity decreasing blood hyperviscosity and antithrombogenic activity]. Patent RUS № 2368376 C1. 27.09.2009. Available at: <https://new.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=2dd769e1785fe39dfd1f744dee2cfa8>. Accessed: 04.10. 2021. (In Russ.)

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-113-121>
УДК 615.322



Оригинальная статья / Research article

Регрессионный анализ в разработке методики выделения и количественного определения водорастворимых полисахаридов из корней подсолнечника однолетнего

Н. А. Дьякова*

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ВГУ), 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

*Контактное лицо: Дьякова Нина Алексеевна. E-mail: Ninochka_V89@mail.ru

ORCID: Н. А. Дьякова – <https://orcid.org/0000-0002-0766-3881>.

Статья поступила: 10.01.2022

Статья принята в печать: 14.02.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Корни подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus* L.) преимущественно являются отходами сельскохозяйственных предприятий при возделывании данной культуры. При этом они отличаются богатым химическим составом и содержат водорастворимые полисахариды, основу которых составляет инулин.

Цель. Цель исследования – подбор оптимальных параметров ультразвуковой экстракции водорастворимых полисахаридов из корней подсолнечника однолетнего на основе регрессионного анализа.

Материалы и методы. Для проведения эксперимента использовали сырье, приобретенное в одной из аптек города Воронежа. Образец сырья (1,0 грамм) помещался в ультразвуковую ванну Град 40-35, позволяющую поддерживать необходимую температуру и частоту ультразвука с заданной продолжительностью времени. Затем мерной колбой отмеряли 10 (15 или 20) мл очищенной от примесей воды очищенной с температурой от 60 °C до 80 °C и производили экстрагирование от 10 до 20 минут с кратностью от 1 до 3, при этом после каждого одного из кратных исследований производили фильтрацию далее заливали то же сырье новым растворителем.

Результаты и обсуждение. Исходные условия и полученные при проведении опытов данные позволили представить регрессионную модель в виде уравнения линейной множественной регрессии, которую с достаточной точностью можно использовать при прогнозировании и анализе. Адекватность модели подтверждена проверкой гипотез по χ^2 -критерию Пирсона. При определении тесноты общей взаимосвязи исходных и полученных данных использовался коэффициент корреляции, полученный на основе значений коэффициента регрессии и среднеквадратичного отклонения. Кроме того, проведено подробное изучение выборки тех переменных, приоритет которых был не ярко выражен, путем обработки при фиксации их значений.

Заключение. Наиболее важными условиями экстракции корней подсолнечника однолетнего для получения наиболее стабильной результативности следует считать: температуру экстракции, равной 80 °C; кратность экстракции, равную 3; частоту ультразвука, равную 35 кГц; при этом измельченность сырья может варьировать от 0,5 мм до 2 мм, времени экстрагирования может быть в пределах от 15 мин до 20 мин, соотношение сырья и экстрагента может варьировать от 1 г на 10 мл до 1 г на 15 мл.

Ключевые слова: водорастворимые полисахариды, инулин, ультразвуковая ванна, корни подсолнечника однолетнего, *Helianthus annuus* L.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Н. А. Дьякова придумала и разработала эксперимент, провела исследование и расчеты, написала статью.

Для цитирования: Дьякова Н. А. Регрессионный анализ в разработке методики выделения и количественного определения водорастворимых полисахаридов из корней подсолнечника однолетнего. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):113–121. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-113-121>

Regression Analysis in Development of Method for Isolation and Quantitative Determination of Water-soluble Polysaccharides from Sunflower Roots of One-year-old

Nina A. Dyakova*

Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394006, Russia

*Corresponding author: Nina A. Dyakova. E-mail: Ninochka_V89@mail.ru

ORCID: Nina A. Dyakova – <https://orcid.org/0000-0002-0766-3881>.

Received: 10.01.2022

Revised: 14.02.2022

Published: 25.02.2022

Abstract

Introduction. The roots of one-year-old sunflower (*Helianthus annuus* L.) are mainly wastes of agricultural enterprises when cultivating this crop. At the same time, they differ in a rich chemical composition and contain water-soluble polysaccharides, the base of which is inulin.

Aim. The aim of this study is to select optimal parameters of ultrasonic extraction of water-soluble polysaccharides from sunflower roots of one-year old based on regression analysis.

Materials and methods. For the experiment, raw materials purchased from one of the pharmacies in the city of Voronezh were used. A sample of raw materials (1.0 grams) was placed in an ultrasonic bath Grad 40-35, which allows maintaining the necessary temperature and frequency of ultrasound with a given duration of time. Then, 10 (15 or 20) ml of purified water purified from impurities at a temperature of 60 °C to 80 °C was measured with a measuring flask and extracted from 10 to 20 minutes with a multiplicity of 1 to 3, and after each of the multiple studies, the same raw material was further filtered with a new solvent.

© Дьякова Н. А., 2022

© Dyakova N. A., 2022

Results and discussion. The initial conditions and the data obtained during the experiments made it possible to present the regression model in the form of a linear multiple regression equation, which can be used with sufficient accuracy in prediction and analysis. The adequacy of the model was confirmed by testing hypotheses against Pearson's χ^2 criterion. The correlation coefficient derived from the values of the regression coefficient and the mean square deviation was used in determining the tightness of the overall relationship between the source and the obtained data. In addition, a detailed study of a sample of those variables whose priority was not clearly expressed was carried out by processing when fixing their values.

Conclusion. The most important conditions for extraction of the roots of sunflower of a one-year old should be considered: extraction temperature equal to 80 °C; extraction multiplicity equal to 3; an ultrasound frequency of 35 kHz; Note here that raw material grinding can vary from 0.5 mm to 2 mm, extraction time can range from 15 min to 20 min, ratio of raw material and extractant can vary from 1 g per 10 ml to 1 g per 15 ml.

Keywords: water-soluble polysaccharides, inulin, ultrasonic bath, roots of one-year-old sunflower, *Helianthus annuus* L.

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Nina A. Dyakova invented and developed the experiment, conducted research and calculations, writing of the article.

For citation: Dyakova N. A. Regression analysis in development of method for isolation and quantitative determination of water-soluble polysaccharides from sunflower roots of one-year-old. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):113–121. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-113-121>

ВВЕДЕНИЕ

Подсолнечник однолетний (*Helianthus annuus* L. (syn. *Helianthus aridus* Rydb., *Helianthus pumilus* Pers., *Helianthus macrocarpus* DC., *Helianthus erythrocarpus* Bartl., *Helianthus jaegeri* Heiser, *Helianthus multiflorus* Hook., *Helianthus ovatus* Lehm., *Helianthus petiolaris* hort. ex DC., *Helianthus lenticularis* Dougl., *Helianthus indicus* L., *Helianthus platycephalus* Cass., *Helianthus grandiflorus* Wender. ex Steud., *Helianthus tubaeformis* Nutt.) – однолетнее травянистое растение рода Подсолнечник (*Helianthus*) семейства Астровые (*Asteraceae*), высотой до 2,5–5 м. Широко культивируется в средней полосе России, в частности, Центрально-Черноземном регионе, преимущественно, с последующим получением из его семян масла. Плоды – продолговатой яйцевидные семянки с кожистым околоплодником – имеют длину 9–16 мм и содержат жирное масло (до 52 %), белки (до 22 %), углеводы (до 27 %), фосфолипиды, полиненасыщенные жирные кислоты, стерины, витамины (Е, РР). Получаемое из семян подсолнечника однолетнего масло используется для пищевых, а также технических (производство саломаса, маргарина, мыла, лако-красочной продукции) нужд. Также семена применяются самостоятельно в пищу и в кондитерском деле (для получения халвы) [1–6].

Подсолнечник однолетний имеет стержневую корневую систему, достигающую в длину 2–3 м и составляющую до 25–30 % биомассы растения. Преимущественно корни подсолнечника однолетнего уходят в отходы сельскохозяйственных предприятий при возделывании данной культуры. При этом они

отличаются богатым химическим составом и содержат водорастворимые полисахариды, основу которых составляет инулин, а также алкалоиды, органические кислоты, витамины группы Е, Д, К, А, В, большое количество эссенциальных макро- и микроэлементов (кальций, магний, фосфор, калий, железо, цинк, селен и др.) [7–11]. Корни подсолнечника однолетнего обладают противовоспалительным, желчегонным, мочегонным действиями, применяются при сахарном диабете, артрите, артрозе, желчекаменной и мочекаменной болезнях. Благодаря широкому спектру фармакологической активности корни подсолнечника однолетнего широко используются как лекарственное растительное сырье в виде отвара [12–14]. Таким образом, в медицинской и фармацевтической практике используются водные извлечения из лекарственного растительного сырья подсолнечника однолетнего, а фармакологический эффект обусловлен водорастворимыми соединениями, основу которых составляют водорастворимые полисахариды [15, 16].

Перспективным методом воздействия на лекарственное растительное сырье с целью интенсификации выделения разных биологически активных веществ, в том числе, водорастворимых полисахаридов, является ультразвук частотой 15–35 кГц, что позволяет не только сократить процесс экстракции на 1–2 порядка, но и значительно увеличить выход основного продукта. Использование ультразвука с частотой более 35 кГц приводит к гидролизу биологически активных веществ и в технологии фитопрепаратов не применяется [17–19].

Целью настоящего исследования являлся подбор оптимальных параметров ультразвуковой экстракции водорастворимых полисахаридов из корней подсолнечника однолетнего на основе регрессионного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведение эксперимента по получению инулина из корней подсолнечника однолетнего методом ультразвуковой экстракции детерминируется несколькими одновременно и совокупно действующими заданными параметрами. Поэтому задача исследования стоит в определении зависимости одной зависимой переменной от нескольких объясняющих значений в различных условиях варьирования параметров. Решение данной задачи можно найти, проведя множественный, или многофакторный регрессионный анализ [20, 21].

Различают уровни фактора проведения эксперимента, к которым следует отнести количественные и качественные. Качественные факторы следует учитывать на начальном этапе это качество и состояние сырья, оборудование. Для проведения эксперимента использовали сырье, приобретенное в одной из аптек города Воронежа («Корень подсолнечника», 6 упаковок, производитель ООО «Хорст», серия 161020, свидетельство о государственной регистрации RU.77.99.88.003.E.004300.10.17 от 03.10.2017, ТУ 10.89.19-175-14721358-2017). Отбор проб проводили в соответствии с ОФС.1.1.0004.15. Сырье измельчалось до однородной массы, отсеивалось через комплект сит с размерностями 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 мм. Образец сырья (1,0 грамм), взвешенный на весах A&D GH-202 (A&D, Япония), помещался в ультразвуковую ванну Град 40-35, позволяющую поддерживать необходимую температуру и частоту ультразвука с заданной продолжительностью времени. Затем мерной колбой отмеряли 10 (15 или 20) мл очищенной от примесей воды очищенной с температурой от 60 °C до 80 °C и производили экстрагирование от 10 до 20 минут с кратностью от 1 до 3, при этом после каждого одного из кратных исследований производили фильтрацию далее заливали то же сырье новым растворителем. Осаждение водорастворимых полисахаридов проводили 95%-ым спиртом этиловым, который брали в трехкратном объеме по отношению к получаемому водному извлечению. Осадок отфильтровывали под вакуумом при остаточном давлении 0,03–0,07 МПа, высушивали до постоянной массы в воздушном стерилизаторе Витязь ГП-40 (ОАО «Витязь», Республика Беларусь). Количественными факторами экстракции являются: измельченность сырья (x_1 , мм), температура (x_2 , °C), кратность экстракции (x_3), длительность экстракции (x_4 , мин), частота ультразвука (x_5 , кГц) и соотношение сырья и экстрагента (x_6 , г:мл). Определяли содержание гравиметрически осаждаемых водорастворимых полисахаридов (y , %).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем случае система имеет два состояния уровней факторов (исходное состояние смеси и готовый экстракт), при меняющихся 6 факторах минимально необходимое число опытов составит 64. В случае фиксации одного или нескольких факторов число опытов может значительно уменьшиться. Но для качественного анализа адекватности выбранного способа следует провести такое количество опытов, которое позволит экспериментально определить значения выбранных параметров, при которых условия получения инулина протекают с лучшей результативностью, и выполнить статистическую оценку полученных данных по выбранной методике (таблица 1).

Проверка гипотезы о согласованности условий эксперимента и отсутствия в них случайных событий проверялась путем анализа дисперсий их распределения. Для данного рода исследований, связанных с проверкой однородности дисперсий применяют G-критерий Кохрена [20].

Для получения значений указанного критерия произведем расчет арифметического среднего – $\bar{X}$; стандартной ошибки – $S_{\bar{x}}$; дисперсии – S^2 ; стандартного отклонения (оно же среднеквадратическое отклонение, коэффициент вариации) – S (таблица 2).

Данные таблица 2 при уровне значимости $\alpha = 0,05$, числе степеней свободы 5 и количестве дисперсий 68, позволили получить значения $G = 0,017$ и $G_{\text{крит.}} = 0,08$, что обуславливает гипотезу об однородности данных ($G < G_{\text{крит.}}$), и подтверждает, статистическую надежность условий проведения эксперимента, а также отсутствие случайных событий.

Анализ полученных результатов позволяет судить об их линейной зависимости, в связи с чем, следует рассматривать линейную функцию множественной регрессии [20]. Для проведения оценки регрессии введем ограничения рассмотрения линейного соотношения между зависимой переменной y и объясняющими переменными $x_1 - x_6$.

Общее уравнение для шести переменных будет иметь вид:

$$y_{\text{расчетн.}} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_5x_5 + b_6x_6, \quad (1)$$

где не учитываем аддитивную составляющую – переменную u , дающую суммарный эффект от воздействия всех неучтенных факторов и случайностей

$$y_{\text{эксперим.}} = y_{\text{расчетн.}} - u. \quad (2)$$

Регрессия линейного вида для исследуемых данных будет представлена формулой:

$$y_{\text{расчетн.}} = b_0 + b_1d_1 + b_2T_2 + b_3n_3 + b_4t_4 + b_5f_5 + b_6p_6, \quad (3)$$

где $d_1, T_2, n_3, t_4, f_5, p_6$ нам известны, а $b_1, b_2, b_3, b_4, b_5, b_6$ определим:

Таблица 1. Результаты количественного определения водорастворимых полисахаридов

Table 1. Results of quantitative determination of water-soluble polysaccharides

N	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	y	N	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	y
1	1,0	80	1	30	30	10	9,06	33	2,0	60	2	30	35	10	7,25
2	1,0	80	2	30	30	10	14,43	34	2,0	60	3	30	35	10	8,18
3	1,0	80	3	30	30	10	16,25	35	2,0	70	1	30	35	10	7,62
4	1,0	80	1	30	30	15	12,08	36	2,0	70	2	30	35	10	9,81
5	1,0	80	2	30	30	15	16,21	37	2,0	70	3	30	35	10	11,36
6	1,0	80	3	30	30	15	17,29	38	2,0	80	1	30	35	10	12,71
7	1,0	80	1	30	30	20	10,12	39	2,0	80	2	30	35	10	14,12
8	1,0	80	2	30	30	20	11,85	40	2,0	80	3	30	35	10	15,58
9	1,0	80	3	30	30	20	13,69	41	1,0	80	1	20	25	10	8,10
10	1,0	80	1	30	25	10	9,75	42	1,0	80	2	20	25	10	11,83
11	1,0	80	2	30	25	10	13,24	43	1,0	80	3	20	25	10	15,51
12	1,0	80	3	30	25	10	15,32	44	1,0	80	1	40	30	10	12,47
13	1,0	80	1	40	35	10	12,48	45	1,0	80	2	40	30	10	15,13
14	1,0	80	2	40	35	10	14,91	46	1,0	80	3	40	30	10	17,81
15	1,0	80	3	40	35	10	15,60	47	1,0	80	1	40	35	10	13,26
16	1,0	80	1	30	35	10	11,95	48	1,0	80	2	40	35	10	15,75
17	1,0	80	2	30	35	10	13,84	49	0,5	80	3	40	35	10	17,02
18	1,0	80	3	30	35	10	17,76	50	1,0	70	3	40	30	15	13,25
19	0,5	60	1	30	35	10	6,12	51	1,0	70	3	40	30	20	14,52
20	0,5	60	2	30	35	10	7,58	52	1,0	70	3	40	35	15	15,74
21	0,5	60	3	30	35	10	9,75	53	1,0	70	3	40	35	20	14,18
22	0,5	70	1	30	35	10	10,15	54	0,5	80	3	40	25	10	16,67
23	0,5	70	2	30	35	10	12,44	55	1,0	80	3	40	25	10	17,53
24	0,5	70	3	30	35	10	14,07	56	1,0	80	3	40	35	10	16,76
25	0,5	80	1	30	35	10	10,74	57	1,0	80	3	40	30	10	17,11
26	0,5	80	2	30	35	10	14,26	58	1,0	80	3	40	25	15	13,75
27	0,5	80	3	30	35	10	17,32	59	1,0	80	3	40	25	20	14,53
28	1,0	60	1	30	35	10	7,04	60	0,5	80	3	30	35	10	15,76
29	1,0	60	2	30	35	10	8,85	61	1,0	80	3	40	35	20	12,35
30	1,0	60	3	30	35	10	11,22	62	1,0	80	3	40	30	15	15,87
31	1,0	70	1	30	35	10	12,10	63	1,0	80	3	40	30	20	13,06
32	1,0	70	2	30	35	10	14,37	64	1,0	80	3	30	35	20	14,74

Для решения общий вид уравнения регрессии будет иметь вид:

$$y_{\text{расчетн.}} = b_0x_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_5x_5 + b_6x_6, \quad (4)$$

где x_0 неэффективный фактор равный 1.

Математическая модель множественной регрессии метода наименьших квадратов (формула 5) требует использования матричных обозначений и владения техникой матричной алгебры:

$$b = [x^T][x]^{-1} [x^T] y_{\text{расчетн.}} \quad (5)$$

Для компактности изложения примененных некоторых стандартных вычислительных процедур, представлены их результаты и описание. Введем вектор $y_{\text{расчетн.}}$ и значения наблюдений объясняющих значений функции таблицы 2 транспонируем в матрицу $[x]$ размерности количества строк по количеству переменных и количеству столбцов равному числу опытов (64). Затем вычислим матричное произведение

двух массивов транспонированной матрицы и исходной, $[x^T][x]$ затем найдем обратную матрицу $[[x^T][x]]^{-1}$ и вектор $[x^T] y_{\text{расчетн.}}$ с размерностями 7×7 . Из выражения 5 произведение обратной матрицы и вектора позволит получить результирующую матрицу в виде вектор столбца значений b (таблица 3).

Таким образом, уравнение регрессии для проведенного экспериментального исследования выделения водорастворимых полисахаридов способом ультразвукового экстрагирования будет иметь вид:

$$y_{\text{расчетн.}} = 32,069x_0 + (-0,564x_1) + 0,365x_2 + 32,93x_3 + 011x_4 + (60,213x_5 + 0,254x_6).$$

В соответствии с формулой 6 получим расчетные значения y (таблица 4).

По полученным данным результирующих зависимостей различными способами построим зависимости экспериментальных и расчетных значений y путем градации экспериментально полученных результатов при взаимосвязи с расчетными от меньшего к большему (рисунок 1).

Таблица 2. Межгрупповая обработка условий проведения эксперимента

Table 2. Inter-group treatment of experimental conditions

№ п/п	X_{cp}	S	S^2	S_x	№ п/п	X_{cp}	S	S^2	S_x
1	25,50	12,12	880,70	29,68	33	23,33	9,26	514,27	22,68
2	25,67	12,05	871,07	29,51	34	23,50	9,18	505,90	22,49
3	25,83	11,98	861,77	29,36	35	24,83	10,70	686,97	26,21
4	26,33	11,93	853,87	29,22	36	25,00	10,63	677,60	26,03
5	26,50	11,86	843,90	29,05	37	25,17	10,56	668,57	25,86
6	26,67	11,79	834,27	28,88	38	26,50	12,14	884,30	29,74
7	27,17	11,80	835,37	28,90	39	26,67	12,07	874,27	29,57
8	27,33	11,73	825,07	28,72	40	26,83	12,00	864,57	29,40
9	27,50	11,66	815,10	28,55	41	23,00	12,05	871,20	29,52
10	24,67	12,08	875,87	29,60	42	23,17	11,99	862,57	29,37
11	24,83	12,02	866,57	29,44	43	23,33	11,93	854,27	29,23
12	25,00	11,96	857,60	29,28	44	27,17	12,35	915,37	30,26
13	28,00	12,42	925,20	30,42	45	27,33	12,28	905,07	30,08
14	28,17	12,35	914,57	30,24	46	27,50	12,21	895,10	29,92
15	28,33	12,28	904,27	30,07	47	28,00	12,42	925,20	30,42
16	26,33	12,21	893,87	29,90	48	28,17	12,35	914,57	30,24
17	26,50	12,14	883,90	29,73	49	28,33	12,28	904,27	30,07
18	26,67	12,07	874,27	29,57	50	26,67	10,60	674,27	25,97
19	22,83	9,48	539,77	23,23	51	27,50	10,45	655,10	25,59
20	23,00	9,41	531,20	23,05	52	27,50	10,69	685,10	26,17
21	23,17	9,34	522,97	22,87	53	28,33	10,52	664,27	25,77
22	24,50	10,84	705,10	26,55	54	27,50	12,21	895,10	29,92
23	24,67	10,77	695,87	26,38	55	26,67	12,21	894,27	29,90
24	24,83	10,70	686,97	26,21	56	28,33	12,28	904,27	30,07
25	26,17	12,27	903,77	30,06	57	27,50	12,21	895,10	29,92
26	26,33	12,21	893,87	29,90	58	27,50	12,01	865,10	29,41
27	26,50	12,14	884,30	29,74	59	28,33	11,86	844,27	29,06
28	23,00	9,41	531,20	23,05	60	29,17	12,05	871,77	29,53
29	23,17	9,33	522,57	22,86	61	30,00	11,89	847,60	29,11
30	23,33	9,26	514,27	22,68	62	28,33	12,00	864,27	29,40
31	24,67	10,77	695,87	26,38	63	29,17	11,84	841,77	29,01
32	24,83	10,70	686,57	26,20	64	27,50	11,87	845,10	29,07

Таблица 3. Значения коэффициентов регрессии

Table 3. Values of regression coefficients

Параметр Parameter	B_0	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	B_6
Значения Values	-32,069	-0,564	0,365	2,930	0,110	0,213	0,254

Из графика, представленного на рисунке 1 следует, что визуально расчетная ломаная прямая описывает результаты значений, полученных экспериментально, из чего предварительно можно судить о положительном проведенном регрессионном анализе.

Гипотеза о согласованности значений эксперимента и полученных теоретически проверяется путем анализа распределения этой статистики. Для данного рода исследований наиболее часто используют: χ^2 -критерий Пирсона, F-критерий Фишера или t-критерий Стьюдента [21].

Для нахождения общей степени согласия расхождении при оценке экспериментальных и теоретических результатов целесообразно применять χ^2 -кри-

терий согласия Пирсона (хи-квадрат). Это наиболее часто применяемый статистический критерий при анализе данных. Критерий отвечает на вопрос, с одинаковой ли частотой встречаются разные значения признака в и распределениях, и определяется по формуле [20]:

$$\chi^2_{\text{эмпирич.}} = \sum_{i=1}^n \frac{(y_{i \text{ эксперим.}} - y_{i \text{ расчетн.}})^2}{y_{i \text{ расчетн.}}} \quad (7)$$

Откуда, из данных таблиц 1 и 4 вычислим $\chi^2_{\text{эмпирич.}} = 26,59$. Критическое значение хи-квадрат является табличным значением и составит $\chi^2_{\text{таблич.}} = 87,1$ при количестве степеней свободы $n - 1 = 67$ [21].

Таблица 4. Расчетные значения y

Table 4. Calculated values of y

№ опыта experience	$y_{\text{расчетн.}}$ y_{rated}	№ опыта experience	$y_{\text{расчетн.}}$ y_{rated}	№ опыта experience	$y_{\text{расчетн.}}$ y_{rated}	№ опыта experience	$y_{\text{расчетн.}}$ y_{rated}
1	9,06	18	17,76	35	7,62	52	15,74
2	14,43	19	6,12	36	9,81	53	14,18
3	16,25	20	7,58	37	11,36	54	16,67
4	12,08	21	9,75	38	12,71	55	17,53
5	16,21	22	10,15	39	14,12	56	16,76
6	17,29	23	12,44	40	15,58	57	17,11
7	10,12	24	14,07	41	8,10	58	13,75
8	11,85	25	10,74	42	11,83	59	14,53
9	13,69	26	14,26	43	15,51	60	15,76
10	9,75	27	17,32	44	12,47	61	12,35
11	13,24	28	7,04	45	15,13	62	15,87
12	15,32	29	8,85	46	17,81	63	13,06
13	12,48	30	11,22	47	13,26	64	14,74
14	14,91	31	12,10	48	15,75		
15	15,60	32	14,37	49	17,02		
16	11,95	33	7,25	50	13,25		
17	13,84	34	8,18	51	14,52		

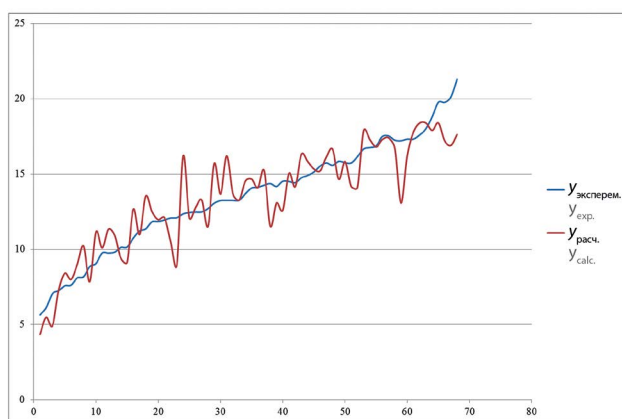


Рисунок 1. Диаграмма зависимости $y_{\text{эксперим.}}$ и $y_{\text{расчетн.}}$

Figure 1. Dependency Diagram $y_{\text{эксперим.}}$ и $y_{\text{расчетн.}}$

Поскольку $\chi^2_{\text{эмпирич.}} < \chi^2_{\text{таблич.}}$, то выдвинутая гипотеза (уравнение регрессии) подтверждается, следовательно, степень расхождения между эмпирическими и теоретическими частотами минимальная.

Кроме того, оценку значимости уравнения регрессии возможно осуществить при помощи параметрического F-критерия Фишера (F-распределения), который служит для определения достоверности различий между дисперсиями полученных результатов и показывает уровень однородности данных в выборках [20]. Составим матрицу оценки качества модели F-распределения (таблица 5) на основе вычислений и данных из пакета анализа в программе MS Excel 2016.

Из данных таблицы 5 следует, что коэффициент детерминации и коэффициент множественной корреляции (индекс корреляции) являются показателями, отражающими тесноту связи и точность регрессии, чем ближе они к единице, тем лучше регрессия

аппроксимирует эмпирические данные, тем теснее наблюдения примыкают к линии регрессии и тем больше он отражает тесноту связи построенной модели под воздействием изучаемых объясняющих факторов. На основании того, что $(R)R^2 > 0,7$, то следует сделать вывод о том, что связь полученных результатов с выбранными параметрами вариации хорошая и функциональная форма выбрана верно.

Таблица 5. Матрица оценки качества регрессии F-распределения

Table 5. F-Distribution Regression Quality Estimation Matrix

Расшифровка расчетных показателей Decryption of calculated indicators	Формула Formula	Полученное значение Value Received
Среднее значение зависимой переменной Average value of dependent variable	$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_{\text{эксп.}}$	13,53
Коэффициент детерминации Determination factor	$R^2 = \frac{\sum (y_{\text{расч.}} - \bar{y})^2}{\sum (y_{\text{эксп.}} - \bar{y})^2}$	0,8
Коэффициент множественной корреляции (индекс корреляции) Multiple correlation coefficient (correlation index)	$R = \sqrt{\frac{\sum (y_{\text{расч.}} - \bar{y})^2}{\sum (y_{\text{эксп.}} - \bar{y})^2}}$	0,89
F-критерий Фишера Fisher F-test	$F = \frac{R^2/k}{(1-R^2)/(n-m-1)}$	1,44
Критическое значение (F-критерия Фишера) Critical value (Fischer F-test)	Табличное значение Table value	1,99

Если фактическое значение $F < F_{\text{крит.}}$, то коэффициент детерминации статистически значим, следовательно, найденная оценка уравнения регрессии статистически надежна при заданном уровне $\alpha = 0,05$ [20].

Кроме того, сравнивались дисперсии распределения регрессии и эксперимента, в результате чего было установлено, что данные относятся к одной генеральной совокупности ($F = 1,44 < F_{\text{табл.}} = 1,99$, при $S_1 = 13,16$; $S_2 = 10,70$).

Что касается t-критерия Стьюдента, то он используется для установления сходства-различия средних арифметических значений в двух выборках или в более общем виде, для установления сходства-различия двух эмпирических распределений, когда дисперсии в двух выборках совпадают [для наших выборок $D_{\text{эксперим.}}(13,16) > D_{\text{расчетн.}}(10,70)$], в связи с чем его следует исключить [20].

С целью оценки качества регрессионной модели используют среднюю ошибку выполненной аппроксимации [20]:

$$e_{\text{отн.}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|y_{\text{расч.}} - y_{\text{эксп.}}|}{y_{\text{эксп.}}} 100 = 9,31 \%, \quad (8)$$

которая позволяет сделать вывод о рассеянии экспериментальных точек относительно линии регрессии в пределах 9,31 %, что характеризует адекватно построенное уравнение регрессии.

Для определения тесноты зависимости результатов эксперимента X_i от Y используют коэффициент корреляции. Изначально подходящим измерителем тесноты связи X от Y является коэффициенты регрессии b , но он показывает на сколько в среднем изменяется Y , когда X увеличивается на одну единицу, что в отдельных случаях может показывать очень абстрактное представление. Для сравнения данных по различным характеристикам между собой используется стандартная единица измерения переменной, называемая среднеквадратичным отклонением (СКО) s , которое определяется:

$$s_{x,y} = \sqrt{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}. \quad (9)$$

Для того чтобы сравнить, на сколько величин s_y изменится в среднем Y , когда X увеличится на одно s_x применяется величина называемая коэффициентом корреляции, который определяется по формуле:

$$r = b_1 \frac{s_x}{s_y}. \quad (10)$$

В соответствии с полученными данными определим тесноту связи переменных x_{1-6} с соответствующими им значениями $y_{\text{эксперим.}}$ (таблица 6).

На 5 % уровне коэффициент корреляции статистически значим для x_1, x_2, x_3, x_4, x_5 . Особо ярко выражен у переменных (уровень значимости более 30 %), которые в последующих опытах можно зафиксировать на значениях $x_2 = 80$, $x_3 = 3$, $x_4 = 30-40$ как наиболее предпочтительные при получении наиболее ста-

бильной результативности. Связь между полученными данными и переменными тесная, за исключением переменной x_1 , которую следует исследовать наиболее тщательно. Для более подробного изучения стабильности получения данных исследования, также нельзя исключать влияние переменных x_5 и x_6 . Из анализа полученных данных следует, что теснота взаимосвязи между выбранными показателями выражена достаточным уровнем значимости. Это позволяет судить о правильном выборе параметров, их значений и адекватности проведенного эксперимента.

Таблица 6. Определение коэффициента корреляции между переменными

Table 6. Determination of correlation coefficient between variables

Показатели СКО MSE indicators	s_{x_1}	s_{x_2}	s_{x_3}	s_{x_4}	s_{x_5}	s_{x_6}
Значения s_{x_i} Values s_{x_i}	0,52	3,63	0,84	5,58	3,61	3,59
Показатели СКО $s_{y_{\text{эксперим.}}}$ MSE indicator $s_{y_{\text{эксп.}}}$	$s_{y_{\text{эксперим.}}}$ $s_{y_{\text{эксп.}}}$					
Значение $s_{y_{\text{эксперим.}}}$ Values $s_{y_{\text{эксп.}}}$	3,62					
Показатели коэффициента корреляции r_i Correlation coefficient indicators r_i	r_1	r_2	r_3	r_4	r_5	r_6
Значения Values	0,08	0,32	0,64	0,43	0,15	0,112

Когда определены значения параметров оказывающих наибольшую тесноту связи на полученные результаты, проведем оценку выборки с рекомендуемыми значениями исходных данных, рассмотренными ранее (таблица 7).

Таблица 7. Результаты эксперимента с рекомендовано-зафиксированными данными

Table 7. Results of the recommended-fixed data experiment

N	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	y
1	1,0	80	3	40	25	20	14,26
2	2,0	80	3	30	35	10	14,43
3	1,0	80	3	20	25	10	15,60
4	1,0	80	2	40	30	10	14,07
5	1,0	80	3	40	35	10	15,87
6	1,0	80	3	40	30	10	16,25
7	1,0	80	3	40	35	15	15,74
8	1,0	80	3	40	30	15	16,21
9	1,0	80	3	30	35	10	16,76
10	1,0	80	3	30	30	10	14,43
11	1,0	80	3	30	25	10	15,32
12	1,0	80	3	40	35	10	14,91
13	0,5	80	3	30	35	10	17,02
14	1,0	80	3	40	25	10	17,32
15	1,0	80	3	40	35	15	15,87
16	1,0	80	3	40	35	10	15,58
17	1,0	80	3	40	30	10	17,76
18	1,0	80	3	30	30	15	17,29

Из данных таблицы 7 следует, что в соответствии с формулой 1 количество проведенных опытов соответствует их минимальному количеству равному 8, и позволяет приступить к дальнейшей оценке. Так как произведена фиксация переменных x_2, x_3, x_4 , то примем их за постоянные условия эксперимента и в дальнейших расчетах учитывать не будем.

В соответствии с имеющимися данными таблицы 7 определим тесноту связи переменных x_4, x_5, x_6 , при фиксации каждого параметра в отдельности с соответствующими результатами экспериментально определенного содержания гравиметрически осаждаемых водорастворимых полисахаридов ($y_{\text{эксперим.}}$) и выделим наиболее предпочтительные параметры этих переменных согласно их уровню статистической значимости (таблица 8).

Таблица 8. Определение коэффициента корреляции между переменными

Table 8. Determination of correlation coefficient between variables

	S_{x_i}	r_i	S_{x_i}	r_i	S_{x_i}	r_i	S_{x_i}	r_i
	Общий General		$x_1 = 2$		$x_5 = 25$		$x_5 = 30$	
S_{x_1}	0,34	0,18	–	–	–	–	–	–
S_{x_5}	4,04	0,29	4,16	0,51	–	–	–	–
S_{x_6}	2,97	0,17	3,25	0,44	5	0,51	2,58	0,57
$S_{\text{Уэксперим.}}$	1,63		1,33		1,16		2,12	
	S_{x_i}	r_i	S_{x_i}	r_i	S_{x_i}	r_i		
	$x_5 = 35$		$x_6 = 10$		$x_6 = 15$			
S_{x_1}	–	–	–	–	–	–		
S_{x_5}	4,08	0,59	–	–	–	–		
S_{x_6}	2,58	0,68	4,16	0,37	2,88	0,52		
$S_{\text{Уиспользов.}}$	1,25		1,47		2,14			

Анализ данных таблицы 8 свидетельствует о том, что в представленной выборке с точки зрения статистической значимости параметры переменной при $x_5 = 25$, не отражает достаточной тесноты связи. Кроме этого показателя $x_1 = 1$ и $x_1 = 3$ не является предпочтительными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения статистической обработки многофакторных экспериментальных исследований следует отметить, что исходные условия и полученные при проведении опытов данные позволили представить регрессионную модель в виде уравнения линейной множественной регрессии, которую с достаточной точностью можно использовать при прогнозировании и анализе. Уровень согласованности исходных данных по критерию Кохрена составил $G=0,017 < G_{\text{крит.}}=0,061$ (при $\Sigma D=52975,17$; $D_{\text{max}}=925,20$; $D_{\text{min}}=505,90$; $\alpha=0,05$; $df=5,00$; $k=68,00$),

что подтверждает однородность и статистическую надежность условий проведения эксперимента.

Для оценки качества модели регрессии определялись коэффициент множественной корреляции $R=0,89$ и коэффициент детерминации $R^2=0,8$ и среднюю ошибку выполненной аппроксимации $e_{\text{отн.}}=6,2$, которые обусловили существенное влияние изучаемых факторов. Адекватность модели подтверждена проверкой гипотез по χ^2 -критерий Пирсона, где $\chi^2_{\text{эмпирич.}}=26,59 < \chi^2_{\text{таблич.}}=87,1$ и F-критерию Фишера, где $F=1,44 < F_{\text{табл.}}=1,99$.

При определении тесноты общей взаимосвязи исходных и полученных данных использовался коэффициент корреляции ($r_1=0,08$, $r_2=0,32$, $r_3=0,64$, $r_4=0,43$, $r_5=0,15$, $r_6=0,112$), полученный на основе значений коэффициента регрессии и среднеквадратичного отклонения. Кроме того, проведено подробное изучение выборки тех переменных, приоритет которых был не ярко выражен, путем обработки при фиксации их значений.

Таким образом, с точки зрения результатов, полученных при статистической обработке экспериментальных данных количественного определения водорастворимых полисахаридов в корнях подсолнечника однолетнего, наиболее важными условиями экстракции для получения наиболее стабильной результативности следует считать: температуру экстракции, равной 80 °C; кратность экстракции, равную 3, при этом измельченность сырья может варьировать от 0,5 мм до 1 мм, частота ультразвука от 30 до 35 кГц, соотношение сырья и экстрагента от 1 г на 10 мл до 1 г на 15 мл, а время экстрагирования может быть в пределах от 30 мин до 40 мин.

Исследования выполнены при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (проект МК-1177.2021.3).

ЛИТЕРАТУРА

- Dwivedi A., Sharma G. A review on Heliotropism plant: *Helianthus annuus* L. *Journal of Phytopharmacology*. 2014;3(2):149–155. DOI: 10.38001/ijlsb.535889.
- Fowler M. W. Plants, medicines and man. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006;86(12):1797–1804. DOI: 10.1002/jsfa.2598.
- Owens G. L., Rieseberg L. H. Hybrid incompatibility is acquired faster in annual than in perennial species of sunflower and tarweed. *Journal of Evolution*. 2014;68(3):893–900. DOI: 10.1111/evo.12297.
- Путырский И. Н., Прохоров В. Н. Универсальная энциклопедия лекарственных растений. М.: Махаон; 2000. 656 с.
- Куркин В. А. Фармакогнозия. Самара: Офорт; 2004. 1180 с.
- Терентьева Е. Подсолнечники. В мире растений. 2002;10:28–35.
- Таова М. Р. Исследование противовоспалительной активности извлечений листьев и корней подсолнечника масличного. *Научное обозрение*. 2010;1:24–26.
- Таова М. Р., Коновалов Д. А. Изучение фенольных соединений листьев подсолнечника однолетнего методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2011;16(11):245–246.

9. Kamal J. Quantification of alkaloids, phenols and flavonoids in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *African Journal of Biotechnology*. 2011;10:3149–3151. DOI: 10.5897/AJB09.1270.
10. Лукашов Р. И., Жак А. В., Жаврид А. В. Антирадикальный эффект извлечений из подсолнечника однолетнего. *Вестник Башкирского государственного медицинского университета*. 2019;4:223–228.
11. Соколова О. А., Котов А. Г., Гонтова Т. Н., Котова Э. Э. Стандартизация сырья подсолнечника однолетнего по макро- и микроскопическим признакам для разработки проекта монографии Государственной фармакопеи Украины. *Вестник фармации*. 2018;1(79):6–11.
12. Соколова О. А., Котов А. Г., Гонтова Т. Н., Котова Э. Э. Разработка методики идентификации фенольных соединений в цветках и листьях подсолнечника однолетнего. *Вестник фармации*. 2018;2(80):18–23.
13. Павлиди М. Р., Коновалов Д. А. Сравнительное ВЭЖХ исследование фенольных соединений листьев подсолнечника однолетнего. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2014;4(52):23–24.
14. Птушова И. В., Коновалов Д. А., Карпенко В. А., Лигай Л. В., Кулешова С. А. Фитохимическое и фармакогностическое изучение корней подсолнечника однолетнего. *Химия растительного сырья*. 2014;2:189–194.
15. Мелик-Гусейнов В. В., Герасименко С. В. Биологически активные вещества и элементный состав корней подсолнечника однолетнего. *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств*. 2013;1:24–26.
16. Мелик-Гусейнов В. В., Герасименко С. В. Идентификация фенольных соединений в подземных органах подсолнечника однолетнего (*Asteraceae*). *Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки*. 2013;3:34–36.
17. Дьякова Н. А. Разработка и валидация экспресс-методики выделения и количественного определения водорастворимых полисахаридов листьев лопуха большого (*Arctium lappa* L.). *Химия растительного сырья*. 2018;4:81–87. DOI: 10.14258/jcprm.2018042195.
18. Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П., Михайловская И. Ю. Изучение динамики изменения содержания инулина в корнях лопуха большого (*Arctium lappa* L.) и одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Webb.) в процессе вегетации. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия, Биология, Фармация*. 2016;4:133–136.
19. Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Самылина И. А., Гапонов С. П., Мындра А. А., Шушунова Т. Г. Разработка и валидация экспресс-методики выделения и количественного определения водорастворимых полисахаридов корней одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.). *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(4):40–43. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-4-40-43.
20. Бондарчук С. С., Бондарчук И. С. Статобработка экспериментальных данных в MS Excel. Томск: Изд. ТГПУ; 2018. 433 с.
21. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера; 2000. 312 с.
22. Kurkin V. A. *Farmakognoziya* [Pharmacognosy]. Samara: Ofort; 2004. 1179 p. (In Russ.)
23. Terent'eva E. *Podsolnechniki* [Sunflowers]. *V mire rastenij*. 2002; 10:28–35. (In Russ.)
24. Taova M. R. Study of anti-inflammation activity of sunflower leaves and roots extracts. *Nauchnoe obozrenie*. 2010;1:24–26. (In Russ.)
25. Taova M. R., Konovalov D. A. Studying of phenolic compounds of leaves of sunflower annual by the method of high-performance liquid chromatography. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Medicina. Farmaciya = Scientific bulletins of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacia*. 2011;16(111):245–246. (In Russ.)
26. Kamal J. Quantification of alkaloids, phenols and flavonoids in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *African Journal of Biotechnology*. 2011;10:3149–3151. DOI: 10.5897/AJB09.1270.
27. Lukashov R. I., Zhah A. V., Zhavrid A. V. Antiradical effect of *Helianthus annuus* extracts. *Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. 2019;4:223–228. (In Russ.)
28. Sokolova O. A., Kotov A. G., Gontovaya T. N., Kotova E. E. Standardization of annual sunflower raw material by macroscopic and microscopic features for the project development of a monograph of State Pharmacopoeia of Ukraine. *Vestnik farmacii*. 2018;1(79):6–11. (In Russ.)
29. Sokolova O. A., Kotov A. G., Gontovaya T. N., Kotova E. E. Development of the identification method of phenolic compounds in flowers and leaves of sunflower. *Vestnik farmacii*. 2018;2(80):18–23. (In Russ.)
30. Pavlidi M. R., Konovalov D. A. Comparative HPLC Study Of Phenolic Compounds In The Leaves Of *Helianthus Annuus*. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta = Journal of Volgograd State Medical University*. 2014;4(52):23–24. (In Russ.)
31. Ptushova I. V., Konovalov D. A., Karpenko V. A., Ligaj L. V., Kuleshova S. A. *Fitohimicheskoe i farmakognosticheskoe izuchenie kornej podsolnechnika odnoletnego* [Phytochemical and pharmacognostic study of annual sunflower roots]. *Himiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*. 2014;2:189–194. (In Russ.)
32. Melik-Guseinov V. V., Gerasimenko S. V. Biologically active substances and elemental composition of common sunflower roots. *Voprosy obespecheniya kachestva lekarstvennykh sredstv = Journal of Pharmaceuticals Quality Assurance Issues*. 2013;1:24–26. (In Russ.)
33. Melik-Guseinov V. V., Gerasimenko S. V. *Identifikatsiya fenol'nykh soedinenij v podzemnykh organakh podsolnechnika odnoletnego (Asteraceae)* [Identification of phenolic compounds in the underground organs of the annual sunflower (*Asteraceae*)]. *Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo oblastnogo universiteta. Seriya: Estestvennye nauki*. 2013;3:34–36. (In Russ.)
34. Dyakova N. A. Development and validation of an express technique of allocation and quantitative determination of water-soluble polysaccharides of leaves of *Arctium lappa* L. *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja = Chemistry of plant raw material*. 2018;4:81–87. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2018042195.
35. Dyakova N. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P., Mihajlovskaya I. Yu. Studying of dynamics of change of content of inulin in roots of *Arctium lappa* L. and *Taraxacum officinale* Webb. in the course of vegetation. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Himiya, Biologiya, Farmaciya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2016;4:133–136. (In Russ.)
36. D'yakova N. A., Slivkin A. I., Samylin I. A., Gaponov S. P., Myndra A. A., Shushunova T. G. Development and validation of an express technique for isolation and quantitative determination of water-soluble polysaccharides from roots of *Taraxacum officinale* Wigg. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(4):40–43. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-4-40-43.
37. Bondarchuk S. S., Bondarchuk I. S. *Statobrabotka eksperimental'nykh dannykh v MS Excel* [Statistical processing of experimental data at MS Excel]. Tomsk: Izd. TGPU; 2018. 433 p. (In Russ.)
38. Rebrova O. Yu. *Statisticheskij analiz medicinskih dannykh. Primenenie paketa prikladnykh program STATISTICA* [Statistical analysis of medical data. Application package STATISTICA]. Moscow: Media-Sfera; 2000. 312 p. (In Russ.)

REFERENCES

1. Dwivedi A., Sharma G. A review on Heliotropism plant: *Helianthus annuus* L. *Journal of Phytopharmacology*. 2014;3(2):149–155. DOI: 10.38001/ijlsb.535889.
2. Fowler M. W. Plants, medicines and man. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006;86(12):1797–1804. DOI: 10.1002/jsfa.2598.
3. Owens G. L., Rieseberg L. H. Hybrid incompatibility is acquired faster in annual than in perennial species of sunflower and tarweed. *Journal of Evolution*. 2014;68(3):893–900. DOI: 10.1111/evo.12297.
4. Putyrskij I. N., Prohorov V. N. *Universal'naya enciklopediya lekarstvennykh rastenij* [Universal Encyclopedia of Medicinal Plants]. Moscow: Mahaon; 2000. 656 p. (In Russ.)



Международная выставка и форум
по фармацевтике и биотехнологиям

5-7 апреля 2022

Санкт-Петербург, Экспофорум, павильон Н

gotoipheb.com

Санкт-Петербург –
лучшее место
для бизнеса



19
стран



3000+
посетителей



100+
экспонентов



Международное событие для участников фармацевтического и смежных рынков (БАД и здоровое питание)

признанная платформа для встречи с ведущими фармацевтическими компаниями
со всего мира на одной площадке

Поддержка:



САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ
ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ
ПАЛАТА

СПХФУ

с 1919 года на службе
торгов и здоровья нации



Санкт-Петербургский
государственный химико-
фармацевтический университет

Организатор:



<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-123-131>
УДК 615.19.072



Оригинальная статья / Research article

Изучение морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной методами люминесцентной и стереомикроскопии

Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева*, А. А. Гудкова, А. И. Сливкин

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ВГУ), 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

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

ORCID: Н. А. Ковалёва – <https://orcid.org/0000-0002-3507-5665>; О. В. Тринеева – <https://orcid.org/0000-0002-1421-5067>; А. А. Гудкова – <https://orcid.org/0000-0002-1275-5000>; А. И. Сливкин – <https://orcid.org/0000-0001-6934-0837>.

Статья поступила: 24.09.2021

Статья принята в печать: 26.01.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Облепиха крушиновидная – *Hippophaë rhamnoides* – многолетний кустарник, плоды которого являются источником каротиноидов и заготавливаются в производственных масштабах для получения ряда лекарственных препаратов. В последнее время всё больший интерес представляют не только плоды, но и другие части растения, такие как почки, листья, побеги и кора. Известно, что листья облепихи богаты такими соединениями, как дубильные вещества, полиненасыщенные жирные кислоты и витамины (С и Е). Богатый состав биологически активных веществ с достаточным содержанием компонентов позволяет рассматривать листья как новый вид лекарственного растительного сырья для дальнейшей разработки различных препаратов на их основе. Кроме того, листья являются ежегодно возобновляемым сырьем и возможна заготовка их в промышленных масштабах, так как данное ценное лекарственное растение культивируется в России повсеместно. Данные о микроскопических признаках плодов облепихи крушиновидной подробно описаны в научной литературе, чего нельзя сказать о листьях. В научной литературе не описаны также особенности люминесценции тканей листьев облепихи крушиновидной.

Цель. Целью настоящей работы являлось изучение возможности применения люминесцентного и стереомикроскопического метода анализа для определения основных морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной.

Материалы и методы. Объектом исследования служили высушенные цельные листья растения рода *Hippophaë*, собранные в Воронежской области. Изучение микроразностных признаков проводили согласно ГФ XIV РФ ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Стереомикроскопическое исследование осуществляли на микроскопе Биомед 2. Люминесценцию тканей листьев облепихи крушиновидной исследовали с использованием люминесцентного микроскопа марки Микромед 3 ЛЮМ.

Результаты и обсуждение. Проведен стереомикроскопический анализ листьев облепихи крушиновидной. Получены объемные изображения высокого разрешения за короткий промежуток времени. Установлено, что характерными микроскопическими признаками листьев является наличие большого количества щитковидных волосков по верхней и щитковидно-звездчатых по нижней поверхностям, включая жилку и черешок (от бесцветного до белого, желтого и темно-бурого цвета). Редко встречаются единичные простые звездчатые волоски. При снятии слоя волосков видно губчатое строение эпидермиса листа. Проведенный люминесцентный анализ позволил выявить особенности свечения тканей листьев облепихи крушиновидной. К диагностическим люминесцентным особенностям следует отнести: наиболее выраженное желтое свечение наблюдается для клеток основания щитковидного волоска; пластинки, из которых состоят щитковидные волоски, не обладают яркой флуоресценцией; звездчатые волоски не имеют свечения; ярко выраженная желто-зеленая флуоресценция характерна для жилки листа.

Заключение. Впервые проведены стереомикроскопический и люминесцентный анализы листьев облепихи крушиновидной и установлены основные морфологические признаки данного вида лекарственного растительного сырья и их биометрические характеристики. Проведенный люминесцентный анализ позволил выявить особенности свечения тканей листьев облепихи крушиновидной.

Ключевые слова: облепиха крушиновидной листья, стереомикроскопия, люминесцентный анализ, морфологические признаки, биометрические характеристики

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Н. А. Ковалёва осуществлял заготовку и сушку образцов сырья, пробоподготовку к проведению анализа, им проведены исследования морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной с применением люминесцентного анализа, а также обозначены все рисунки, отражающие основные результаты работы. О. В. Тринеева написал текст статьи. А. А. Гудкова, А. И. Сливкин консультировал по полученным результатам, участвовал в написании заключения и обсуждения результатов.

Для цитирования: Ковалёва Н. А., Тринеева О. В., Гудкова А. А., Сливкин А. И. Изучение морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной методами люминесцентной и стереомикроскопии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):123–131. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-123-131>

Study of Morphological Features of Sea Buckthorn Leaves by Luminescent and Stereomicroscopy Methods

Natalia A. Kovaleva, Olga V. Trineeva*, Alevtina A. Gudkova, Alexey I. Slivkin

Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394006, Russia

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

© Ковалёва Н. А., Тринеева О. В., Гудкова А. А., Сливкин А. И., 2022

© Kovaleva N. A., Trineeva O. V., Gudkova A. A., Slivkin A. I., 2022

ORCID: Natalia A. Kovaleva – <https://orcid.org/0000-0002-3507-5665>; Olga V. Trineeva – <https://orcid.org/0000-0002-1421-5067>; Alevtina A. Gudkova – <https://orcid.org/0000-0002-1275-5000>; Alexey I. Slivkin – <https://orcid.org/0000-0001-6934-0837>.

Received: 24.09.2021

Revised: 26.01.2022

Published: 25.02.2022

Abstract

Introduction. Sea buckthorn – *Hippophaë rhamnoides* is a perennial shrub, the fruits of which are a source of carotenoids and are harvested on an industrial scale to obtain a number of drugs. Recently, not only fruits, but also other parts of the plant, such as buds, leaves, shoots and bark, are of increasing interest. It is known that sea buckthorn leaves are rich in compounds such as tannins, polyunsaturated fatty acids and vitamins (C and E). The rich composition of biologically active substances with a sufficient content of components allows us to consider leaves as a new type of medicinal plant material for the further development of various preparations based on them. In addition, the leaves are an annually renewable raw material and it is possible to harvest them on an industrial scale, since this valuable medicinal plant is cultivated everywhere in Russia. Data on the microscopic characteristics of the fruits of sea buckthorn are described in detail in the scientific literature, which cannot be said about the leaves. The scientific literature also does not describe the features of the luminescence of the tissues of the leaves of the sea buckthorn.

Aim. The aim of this work was to study the possibility of using the luminescent and stereomicroscopic methods of analysis to determine the main morphological features of the leaves of the sea buckthorn.

Materials and methods. Dried whole leaves of a plant of the genus *Hippophaë*s collected in the Voronezh region were used as the object of the study. The study of microdiagnostic signs was carried out according to the State Pharmacopoeia of the XIV RF GPA.1.5.3.0003.15 «Technique of microscopic and microchemical examination of medicinal plants and herbal medicinal products». A stereomicroscopic study was carried out using a Biomed 2 microscope. The luminescence of the tissues of the sea buckthorn leaves was investigated using a luminescent microscope of the Micromed 3 LUM brand.

Results and discussion. Stereomicroscopic analysis of sea buckthorn leaves was carried out. High-resolution volumetric images were obtained in a short period of time. It was found that the characteristic microscopic features of the leaves are the presence of a large number of corymbose hairs along the upper and corymbose-stellate along the lower surfaces, including the vein and petiole (from colorless to white, yellow and dark brown). Single simple stellate hairs are rare. When removing the layer of hairs, the spongy structure of the epidermis of the leaf is visible. The carried out luminescent analysis made it possible to reveal the features of the luminescence of the tissues of the leaves of the sea buckthorn. Diagnostic luminescent features include: the most pronounced yellow glow is observed for the cells of the base of the corymbose hair; the plates that make up the corymbose hairs do not have bright fluorescence; stellate hairs do not have a glow; pronounced yellow-green fluorescence is characteristic of the leaf vein.

Conclusion. For the first time, stereomicroscopic and luminescent analyzes of sea buckthorn leaves were carried out and the main morphological features of this type of medicinal plant material and their biometric characteristics were established. The carried out luminescent analysis made it possible to reveal the features of the luminescence of the tissues of the leaves of the sea buckthorn.

Keywords: sea buckthorn leaves, stereomicroscopy, luminescence analysis, anatomical and diagnostic signs, biometric characteristics

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Natalia A. Kovaleva carried out the procurement and drying of raw material samples, sample preparation for analysis, he studied the morphological signs of sea buckthorn leaves using luminescent analysis, and also indicated all the drawings reflecting the main results of the work. Olga V. Trineeva wrote the text of the article. Alevtina A. Gudkova, Alexey I. Slivkin consulted on the results obtained, participated in writing the conclusion and discussing the results.

For citation: Kovaleva N. A., Trineeva O. V., Gudkova A. A., Slivkin A. I. Study of morphological features of sea buckthorn leaves by luminescent and stereomicroscopy methods. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):123–131. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-123-131>

ВВЕДЕНИЕ

Облепиха крушиновидная – *Hippophaë rhamnoides* – многолетний кустарник, плоды которого являются источником каротиноидов и заготавливаются в производственных масштабах для получения ряда лекарственных растительных препаратов [1].

В последнее время все больший интерес представляют не только плоды, но и другие части растения, такие как почки, листья, побеги и кора. Активно изучается их химический состав с целью обоснования перспективности применения в медицине и фармации. Известно, что листья облепихи богаты такими соединениями, как дубильные вещества, полиненасыщенные жирные кислоты и витамины (С и Е). Именно на основе дубильных веществ получен противовирус-

ный препарат «Гипорамин». Богатый состав биологически активных веществ (БАВ) с достаточным содержанием компонентов позволяет рассматривать листья облепихи как новый вид лекарственного растительного сырья (ЛРС) для дальнейшей разработки различных препаратов на их основе [1–4]. Кроме того, листья являются ежегодно возобновляемым сырьем и возможна заготовка их в промышленных масштабах, так как данное ценное лекарственное растение культивируется в России повсеместно.

Установление подлинности ЛРС в процессе его стандартизации и оценки качества – одна из главных задач фармакогнозии. Данные о микроскопических признаках плодов облепихи крушиновидной подробно описаны в научной литературе [5], чего нельзя сказать о листьях. Таким образом, исследования по раз-

работке показателей качества данного вида ЛРС, в частности, показателей оценки подлинности, раздела «Внешние признаки», для последующего составления современных проектов ФС являются весьма актуальными.

Цель работы – изучение возможности применения люминесцентного и стереомикроскопического методов анализа для определения основных морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили высушенные цельные листья растения рода *Hippophaë*, собранные в Воронежской области согласно правилам заготовки ЛРС различных морфологических групп. Сушку листьев производили воздушно-теневым способом до остаточной влажности не более 10 %.

Изучение микродиагностических признаков проводили согласно ГФ XIV РФ ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [6]. Стереомикроскопическое исследование осуществляли на микроскопе Биомед 2 (ООО «БИОМЕД», Россия) с объективами $\times 40$, $\times 100$. Получены объемные изображения высокого разрешения за короткий промежуток времени (рисунки 1–6).

Люминесценцию тканей листьев облепихи крушиновидной исследовали с использованием люминесцентного микроскопа марки Микромед 3 ЛЮМ (Россия), оснащенного корпусом люминесцентной насадки с люминесцентными блоками «В»; «Г» (Россия). Источником света служила высоковольтная ртутная лампа (100 Вт); спектральный диапазон возбуждения люминесценции: голубой светофильтр – 410–490 нм, наблюдение в диапазоне 515–700 нм. Визуализацию диагностических призна-

ков осуществляли с помощью видеокамеры Livenhuk C310 NG (КНР) и программным обеспечением Top View ($\times 86$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стереомикроскопический анализ. При рассмотрении листа с поверхности обнаружено, что обе стороны и жилка покрыты простыми многоклеточными щитковидными и щитковидно-звездчатыми волосками (рисунок 1). На верхней стороне листа по частоте встречаемости преобладают волоски щитковидные, сидящие рыхло, не образуя плотного сплетения. Щитковидно-звездчатые волосками прозрачные или белые; цвет щитковидных волосков – бурый или буровато-оранжевый (место прикрепления волоска).

Щитковидные волоски многоклеточные, представляют собой округлый щиток, состоящий из радиально расположенных лучисто вытянутых клеток, сросшихся краями, центральной частью прикрепляющийся к эпидермису (рисунок 2). Щитковидно-звездчатые волоски также многоклеточные, по строению похожи на щитковидные, однако, отличающиеся наличием длинных несросшихся краями лучистых клеток, выходящих из щитка (рисунок 3, б).

На нижней стороне листа также щитковидные волоски буровато-оранжевые; щитковидно-звездчатые – белые или прозрачные, густо расположенные, полностью покрывая эпидермис. По частоте встречаемости преобладают щитковидно-звездчатые волоски (рисунок 3). Редко встречаются единичные многоклеточные звездчатые волоски, состоящие из центральной клетки с отходящими в разные стороны лучами (рисунок 4).

При удалении волосков видно губчатое строение эпидермиса (рисунок 5, а). По жилке (рисунок 5, б) встречаются в основном щитковидные волоски – прижатые, буроватые, на черешке – от светло-желтого до буровато-оранжевого цвета (рисунок 6).



а
а



б
б

Рисунок 1. Вид верхней стороны листа:
щитковидные волоски: а – ув. $\times 40$; б – ув. $\times 100$

Figure 1. View of the upper side of the leaf:
corymbose hairs: а – $\times 40$ magnification; б – $\times 100$ magnification

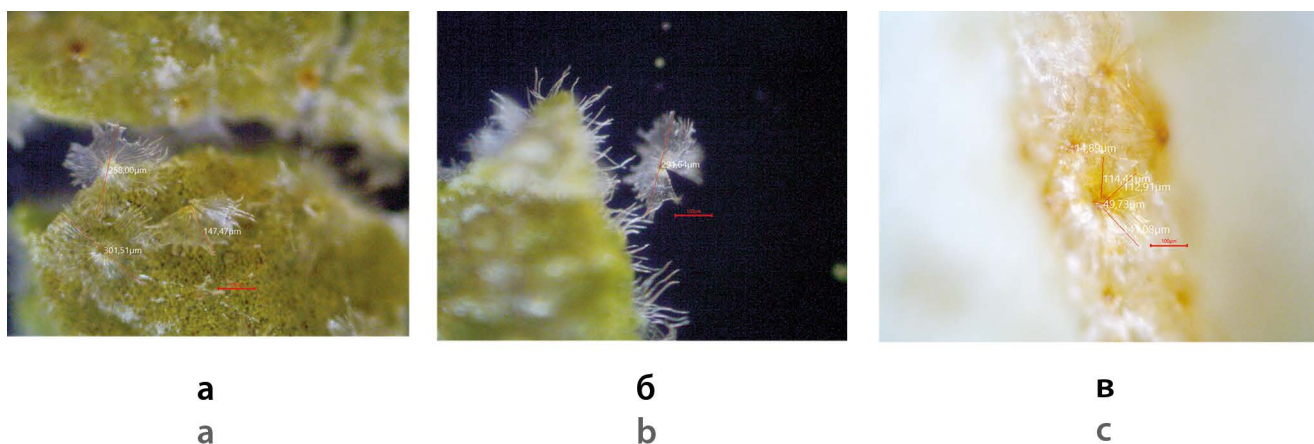


Рисунок 2. Щитковидные волоски (ув. x100)

Figure 2. Thyroid hairs (magnification x100)

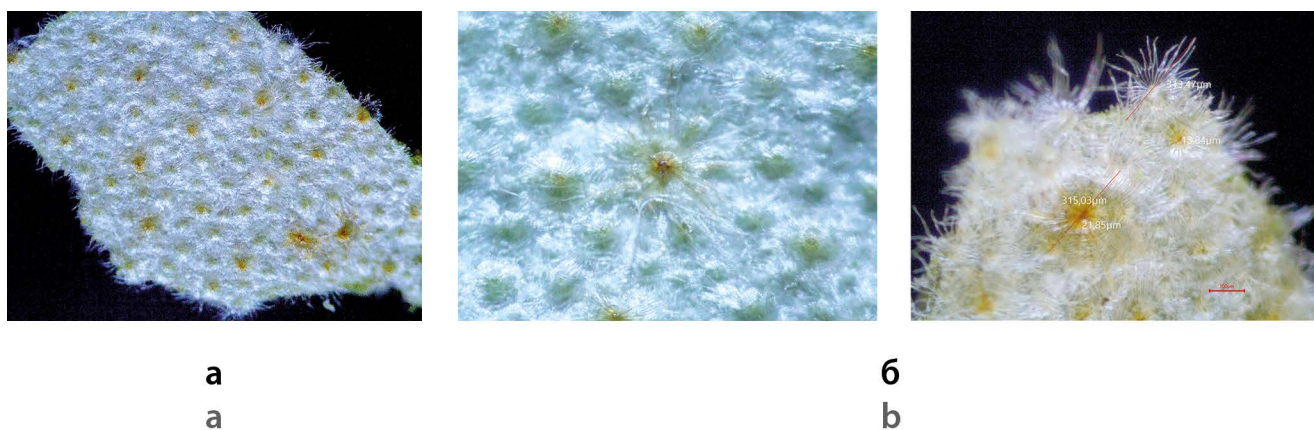


Рисунок 3. Вид нижней стороны листа:

a – ув. x40; б – ув. x100

Figure 3. View of the bottom side of the sheet:

a – magnification x40; b – magnification x100

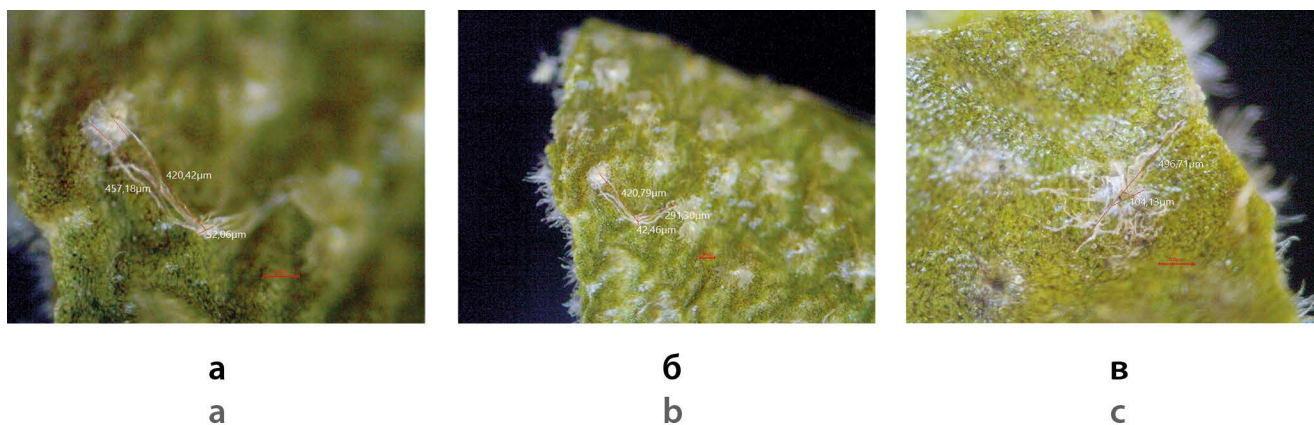


Рисунок 4. Вид звездчатого волоска (ув. x100)

Figure 4. Type of stellate hair (magnification x100)



Рисунок 5. Вид эпидермиса под волосками (а) и щитковидных волосков по жилке на нижней стороне листа (ув. x100)

Figure 5. View of the epidermis under the hairs (a) and corymbose hairs along the vein on the underside of the leaf (magnification x100)

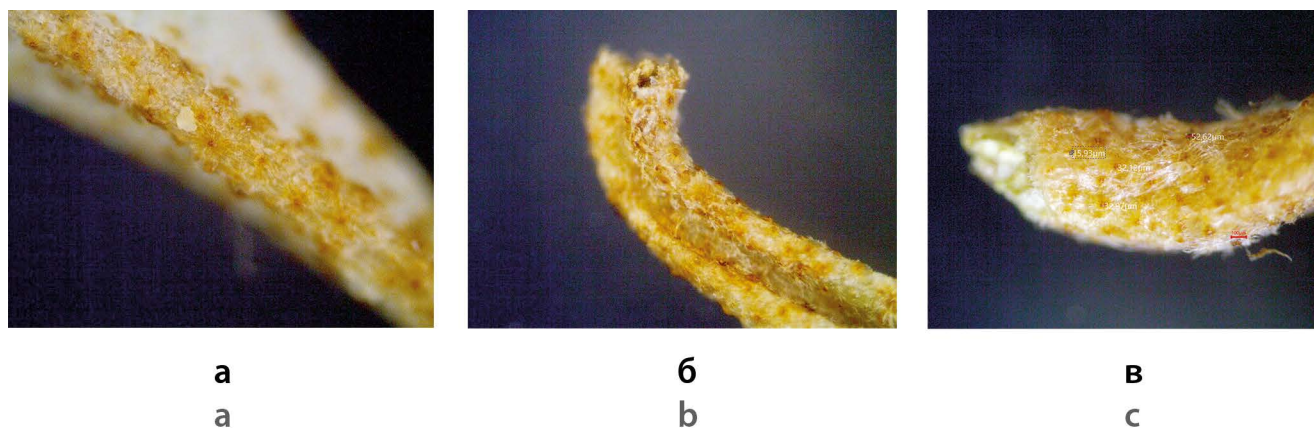


Рисунок 6. Вид жилки у основания черешка (а) и черешок (б и в) (ув. x40); (в – ув. x100)

Figure 6. View of the vein at the base of the petiole (a) and the petiole (b and c) (magnification X40); (c – magnification x100)

В таблице 1 приведены результаты экспериментальных исследований биометрических характеристик основных морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной.

Люминесцентный метод исследования анатомо-диагностических признаков ЛРС, отличающийся высокой чувствительностью и быстротой, находит все более широкое применение при проведении фармакогностического анализа. Метод включен в ГФ РФ XIV издания [6]. Для возбуждения люминесценции используют ультрафиолетовые лучи. При этом происходит поглощение коротковолнового ультрафиолетового излучения исследуемым веществом с последующим испусканием лучей с большей длиной волны (свечение исследуемого объекта). Основное отличие от световой микроскопии – это то, что микропрепарат рассматривается в излучаемом им свете.

В научной литературе не описаны особенности люминесценции тканей листьев облепихи крушиновидной. Известно, что люминесцентные особенности тканей позволяют выявлять локализацию биологичес-

ки активных структур, а также, в некоторых случаях, проводить селективную диагностику ЛРС [7–15]. Люминесцентную микроскопию можно отнести к гистохимическим исследованиям, так как химический состав БАВ в клетках и тканях определяет цвет и интенсивность свечения [7–15].

При люминесцентном анализе облепихи крушиновидной листьев высушенных обнаружена флуоресценция оснований (мест прикрепления) щитковидных и щитковидно-звездчатых волосков, как с верхней, так и с нижней стороны листовой пластинки (рисунок 7). Следует отметить, что нижняя сторона флуоресцирует ярче, чем верхняя. Это связано с наличием большего числа щитковидно-звездчатых волосков и их более плотного расположения.

Исходя из рисунка 8, можно сделать вывод, что именно клетки в месте прикрепления волоска обладают яркой флуоресценцией. При отделении волоска от клеток основания наблюдается бледное желтовато-зеленоватое свечение. Зеленоватый оттенок объек-

Таблица 1. Результаты определения биометрических характеристик основных морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной методом стереомикроскопии

Table 1. Results of determining the biometric characteristics of the main morphological characteristics of sea buckthorn leaves by stereomicroscopy

№ п/п	Морфологический признак Morphological feature	Экспериментальные данные, мкм Experimental data, mkm	Средние значения, мкм Average values, mkm
1	Диаметр щитковидных волосков Diameter of corymbose hairs	108,73–438,14	276,01
2	Диаметр ножек (место прикрепления волосков) Diameter of the legs (place of hair attachment)	11,61–68,00	30,93
3	Звездчатые волоски Stellate hairs	Длина 104,13–457,188 Length 104.13–457.188	Длина 387,68 Length 387.68
		Диаметр основания 42,18–106,99 Base diameter 42.18–106.99	Диаметр основания 80,65 Base diameter 80.65
4	Щитковидно-звездчатые волоски Shield-like stellate hairs	Длина луча 156,74–252,12 Beam length 156.74–252.12	Длина луча 201,06 Beam length 201.06
		Диаметр щитка 150,0–182,66 Shield diameter 150.0–182.66	Диаметр щитка 166,36 Shield diameter 166.36

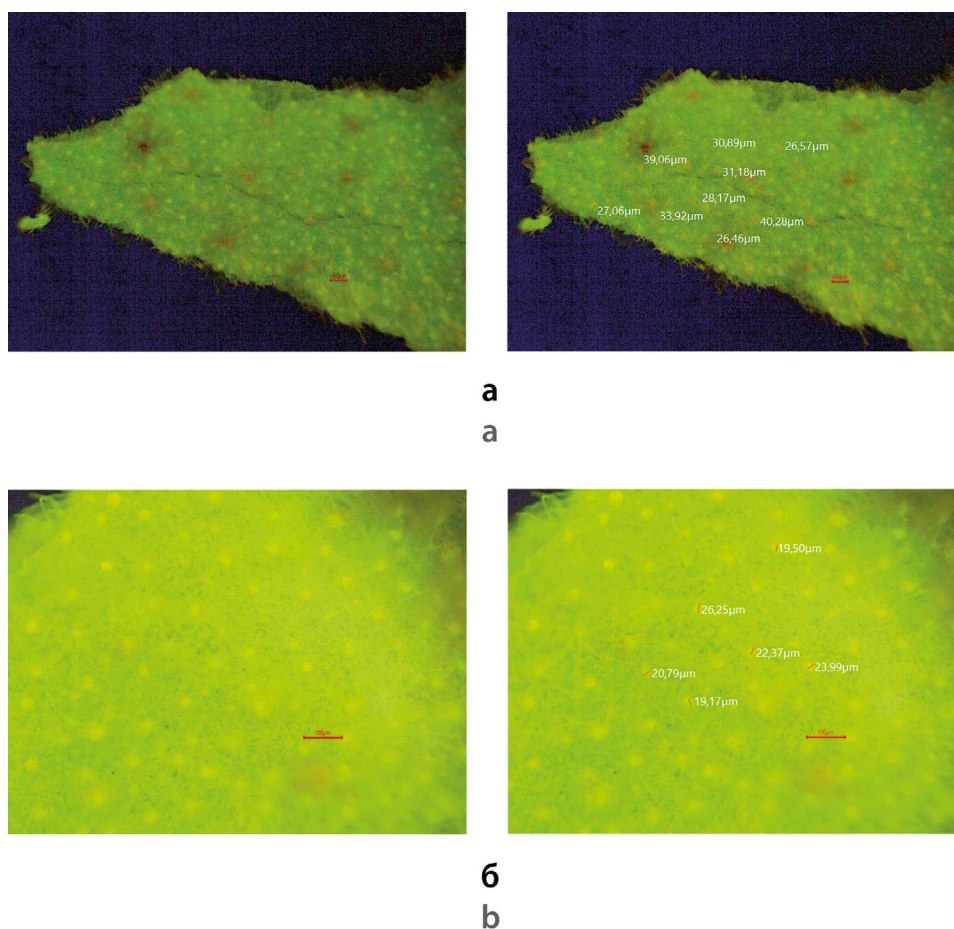


Рисунок 7. Флуоресценция оснований щитковидных и щитковидно-звездчатых волосков с верхней (а) и нижней (б) стороны листа:

а – ув. $\times 40$; **б** – ув. $\times 100$

Figure 7. Fluorescence of the bases of corymbose ischitic-stellate hairs from the up-per (a) and lower (b) sides of the leaf:

а – magnification $\times 40$; **б** – magnification $\times 100$

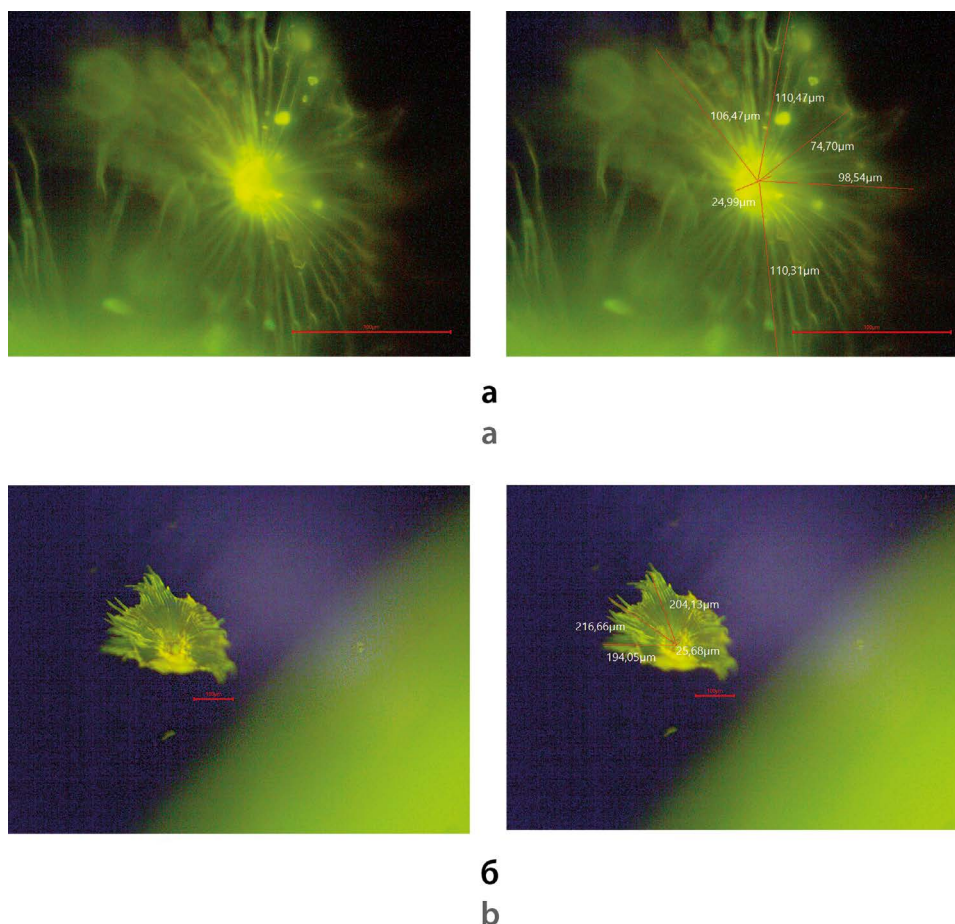


Рисунок 8. Флуоресценция клеток основания (а) и отдельного (б) щитковидного волоска:
а – ув. x400; б – ув. x100

Figure 8. Fluorescence of base cells (a) and separate (b) corymbose hair:
а – magnification x400; б – magnification x100

там придают, содержащиеся в листьях группы фенольных соединений (флавоноиды, дубильные вещества). Пластинки, из которых состоят щитковидные волоски не обладают яркой люминесценцией, слабое свечение характерно для мест сочлинения пластинок волоска.

На жилке листа волоски прижатые, их основания выступают над поверхностью. Ярko выраженная флуоресценция, как на волосках поверхности листа, отсутствует. Однако, стоит отметить, что собственно жилка обладает ярким свечением (рисунок 9).

Звездчатые волоски на фоне флуоресцирующей жилки коричневого цвета и не обладают свечением (рисунок 10).

Метод люминесцентной микроскопии наряду с выявлением мест локализации БАВ, также позволяет оценить биометрические характеристики морфологических признаков и их вариабельность (таблица 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые проведены стереомикроскопический и люминесцентный анализы листьев облепихи крушиновидной и установлены основные

морфологические признаки данного вида ЛРС и их биометрические характеристики. Проведенный люминесцентный анализ позволил выявить особенности свечения тканей листьев облепихи крушиновидной. К диагностическим люминесцентным особенностям следует отнести:

- ✓ Наиболее интенсивное желтое свечение наблюдается для клеток основания щитковидно-звездчатого волоска; основания щитковидных волосков характеризуются слабой флуоресценцией.
- ✓ Пластинки, из которых состоят щитковидные и щитковидно-звездчатые волоски, яркой флуоресценцией не обладают.
- ✓ Звездчатые волоски не имеют свечения.
- ✓ Ярko выраженная желто-зеленая флуоресценция характерна для жилки листа.
- ✓ Проведенные исследования могут быть использованы для экспресс-идентификации листьев облепихи крушиновидной и позволят подготовить раздел «Внешние признаки» для составления проекта ФС «Облепихи крушиновидной листьев».

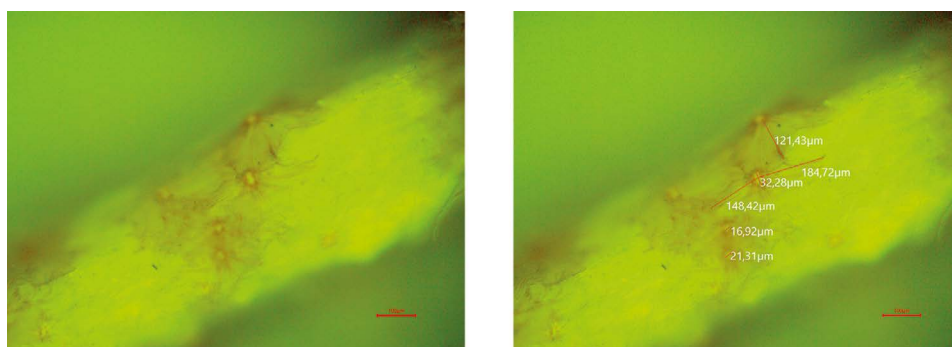


Рисунок 9. Флуоресценция жилки листа (ув. x100)

Figure 9. Leaf vein fluorescence (magnification x100)

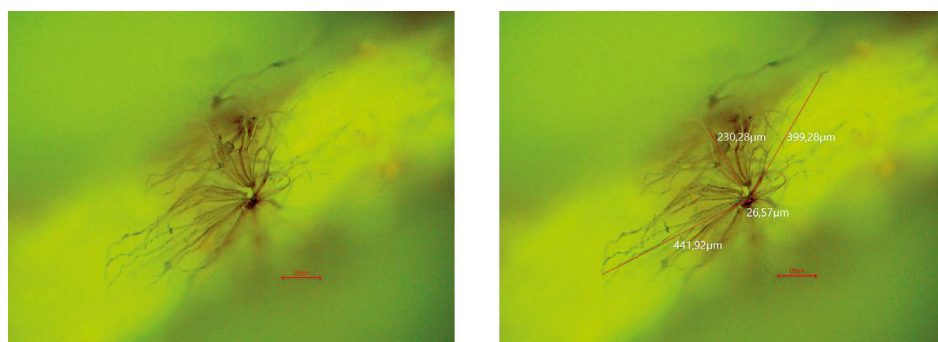


Рисунок 10. Звездчатые волоски на жилке (ув. x100)

Figure 10. Stellate hairs on the vein (magnification x100)

Таблица 2. Люминесценция морфологических признаков листьев

Table 2. Luminescence of morphological signs of leaves

№	Признак Feature	Размер, мкм Size, mkm	Люминесценция Luminescence
1	Щитковидно-звездчатый волосок Shield-stellate hair	Длина лучей 110,31–110,47 Beam length 110.31–110.47	Желтовато-зеленая, слабая Yellowish green, weak
		Диаметр основания 17,26–31,59 Base diameter 17.26–31.59	Желтая, ярко выраженная Yellow, pronounced
3	Жилка Vein	–	Желто-зеленая, ярко выраженная Yellow-green, brightly expressed
4	Щитковидный волосок Scutellum hair	Диаметр щитка 184,72–316,20 Shield diameter 184.72–316.20	Не обладает Does not possess
		Диаметр основания 16,90–39,06 Base diameter 16.90–39.06	
5	Звёздчатый волосок Star hair	Длина лучей 230,28–441,92 Beam length 230.28–441.92	Не обладает Does not possess
		Диаметр основания 26,57 Base diameter 26.57	

ЛИТЕРАТУРА

- Букштынов А. Д., Трофимов Т. Т., Ермаков Б. С., Фаустов В. В., Хабарова З. И., Койков Н. Т., Калинина И. П., Пантелеева Е. И., Шишкина Е. Е., Мочалов В. В., Яркин В. П., Удачин Е. В., Савельев А. Т., Николаев Г. В., Сократова Э. Г., Арбаков К. А., Ковалев С. Н., Прокофьев М. А., Калининченко А. Н., Бартенев В. Д., Вишняков А. В., Карпеченков Л. А., Титов Н. Т., Потапов Ф. Ф., Кошелев Ю. А., Агеева Л. Д., Харламов В. И. Облепиха. М.: Лесная промышленность. 1978. 192 с.
- Абдыкаликова К. А., Нечипоренко Л. П. Фитохимический состав надземной части облепихи крушиновидной. Вестник КГПИ. 2008;4:104–107.
- Айтуарова А. Ш., Жусупова Г. Е. Выделение биологически активных веществ из надземной части растения вида Hipporrhaea rhamnoides L. и возможности их использования в медицине. Вестник Казахского национального медицинского университета. 2016;3:195–197.
- Мельников О. М., Верещагин А. Л., Кошелев Ю. А. Исследование биологически активных соединений почек и листьев мужских

- растений облепихи крушиновидной. *Химия растительного сырья*. 2010;2:113–116.
- Тринева О. В., Рудая М. А., Гудкова А. А. Исследование плодов облепихи крушиновидной различными микроскопическими методами. *Фармация*. 2021;70(1):5–10.
 - Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том 4. М.: Министерство здравоохранения РФ; 2018. 7019 с.
 - Тринева О. В., Гудкова А. А., Рудая М. А. Применение люминесцентной микроскопии в анализе анатомо-диагностических признаков плодов облепихи крушиновидной. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(1):40–45. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-40-45.
 - Астафьева А. А., Куприянова Е. А., Куркин В. А., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В., Помогайбин А. В. Исследование люминесценции тканей побегов тополя краснопольного (*Populus rubrinervis* Hort.) как перспективного источника флавоноидов. В сборнике: *Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы*. Межвузовская научно-практическая конференция, посвященная 100-летию Самарского государственного медицинского университета. 2018. 73–78 с.
 - Васькова А. И., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В. Люминесцентный анализ листьев тысячелистника хрящеватого (*Achillea cartilaginea* Ledeb.). В сборнике: *Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы*. 2017. С. 119–127.
 - Никитина А. С., Логвиненко Л. А., Никитина Н. В., Нигарян С. А. Морфометрическое и гистохимическое исследование травы мелиссы лекарственной из коллекции никитского ботанического сада. *Фармация и фармакология*. 2018;6(6):504–534.
 - Лапина А. С., Куркин В. А., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В. Новые аспекты в морфолого-анатомической диагностике травы монарды дудчатой (*Monarda fistulosa* L.). *Аспирантский вестник Поволжья*. 2019;1–2:19–26.
 - Азизова Т. М., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В. Результаты люминесцентного анализа плодов фенхеля обыкновенного (*Foeniculum vulgare* Mill.). В сборнике: *Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы*. 2017. С. 104–113.
 - Левшанова Е. В., Хусайнова А. И., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В., Куркина А. В. Результаты люминесцентного анализа соцветий пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.). В сборнике: *Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы III Межвузовская научно-практическая конференция, посвященная 100-летию Самарского государственного медицинского университета*. 2018. С. 79–87.
 - Егорова А. В., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В., Зюлин Н. С. Результаты люминесцентного анализа утилизированной надземной части пихты сибирской (*Abies sibirica*). В сборнике: *Современные проблемы фармакогнозии Сборник материалов III Межвузовской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию Самарского государственного медицинского университета*. 2018. С. 111–118.
 - Морозова Т. В. Фармакогностическое исследование некоторых видов рода боярышник (*Crataegus* L.). Дисс. ... канд. фарм. наук. Самара; 2019. 23 с. Доступно по: <https://www.dissercat.com/content/farmakognosticheskoe-issledovanie-nekotorykh-vidov-roda-boyaryshnik-crataegus>. Ссылка активна на 25.11.2021.
 - Mel'nikov O. M., Vereshchagin A. L., Koshelev Yu. A. *Issledovanie biologicheskii aktivnykh soedineniy pochek i list'ev muzhskikh rasteniy oblepikhi krushinovidnoy* [Investigation of biologically active compounds of buds and leaves of male plants of sea buckthorn buckthorn]. *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja = Chemistry of plant raw material*. 2010;2:113–116. (In Russ.)
 - Trineeva O. V., Rudaya M. A., Gudkova A. A. Investigation of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries by different microscopy techniques. *Farmaciya = Pharmacy*. 2021;70(1):5–10. (In Russ.)
 - Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiyskoy Federatsii [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIV ed. Volume 4. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya RF; 2018. 7019 p. (In Russ.)
 - Trineeva O. V., Gudkova A. A., Rudaya M. A. Application of Luminescent Microscopy in Analysis of Anatomic-diagnostic Signs of Fruits of Sea Buckthorn. *Razrabotka i registraciya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(1):40–45. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-40-45.
 - Astaf'eva A. A., Kupriyanova E. A., Kurkin V. A., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V., Pomogaibin A. V. *Issledovanie lyuminescentnykh tkanei pobegov topolya krasnonernynogo (Populus rubrinervis Hort.) kak perspektivnogo istochnika flavonoidov* [Study of the luminescence of tissue shoots of red-nervous poplar (*Populus rubrinervis* Hort.) as a promising source of flavonoids]. V sbornike: *Farmatsevticheskaya botanika: sovremennost' i perspektivy III Mezhvuzovskaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya, posvyashchennaya 100-letiyu Samarskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2018. P. 73–78. (In Russ.)
 - Vas'kova A. I., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V. *Lyuminescentnyi analiz list'ev tysyachelistnika khryashchevatogo (Achillea cartilaginea Ledeb.)*. V sbornike: *Farmatsevticheskaya botanika: sovremennost' i perspektivy* [Luminescence analysis of cartilaginous yarrow (*Achillea cartilaginea* Ledeb.) leaves. In: *Pharmaceutical Botany: Modernity and Perspectives*]. 2017. 119–127 p. (In Russ.)
 - Nikitina A. S., Logvinenko L. A., Nikitina N. V., Nigaryan S. A. Morphometric and histochemical research of Melissa officinalis L. herb from the collection of nikitsky botanic garden. *Farmaciya i farmakologiya = Pharmacy & Pharmacology*. 2018;6(6):504–534. (In Russ.)
 - Lapina A. S., Kurkin V. A., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V. The new aspects in morphological and anatomical diagnostics of the herb Monarda fistulosa L. *Aspirantskii vestnik Povolzh'ya*. 2019;1–2:19–26. (In Russ.)
 - Azizova T. M., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V. *Rezultaty lyuminescentnogo analiza plodov fenkhelya obyknovennogo (Foeniculum vulgare Mill.)*. V sbornike: *Farmatsevticheskaya botanika: sovremennost' i perspektivy* [Results of luminescent analysis of fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). In: *Pharmaceutical Botany: Modernity and Perspectives*]. 2017. P. 104–113. (In Russ.)
 - Levshanova E. V., Khusainova A. I., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V., Kurkina A. V. *Rezultaty lyuminescentnogo analiza sotsvetii pizhmy obyknovennoi (Tanacetum vulgare L.)*. V sbornike: *Farmatsevticheskaya botanika: sovremennost' i perspektivy III Mezhvuzovskaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya, posvyashchennaya 100-letiyu Samarskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Results of luminescent analysis of inflorescences of common tansy (*Tanacetum vulgare* L.). In the collection: *Pharmaceutical botany: modernity and prospects III Interuniversity scientific and practical conference dedicated to the 100th anniversary of the Samara State Medical University*]. 2018. P. 79–87. (In Russ.)
 - Egorova A. V., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V., Zyulin N. S. *Rezultaty lyuminescentnogo analiza utilizirovannoi nadzemnoi chasti pikhty sibirskoi (Abies sibirica)*. V sbornike: *Sovremennye problemy farmakognozii Sbornik materialov III Mezhvuzovskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoi 100-letiyu Samarskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Results of the luminescent analysis of the utilized above-ground part of the Siberian fir (*Abies sibirica*). In the collection: *Modern problems of pharmacognosy Collection of materials of the III Interuniversity scientific and practical conference with international participation, dedicated to the 100th anniversary of the Samara State Medical University*]. 2018. P. 111–118. (In Russ.)
 - Morozova T. V. *Farmakognosticheskoe issledovanie nekotorykh vidov roda boyaryshnik (Crataegus L.)* [Pharmacognostic study of some species of the hawthorn genus (*Crataegus* L.)]. [dissertation]. Samara; 2019. 23 p. Available at: <https://www.dissercat.com/content/farmakognosticheskoe-issledovanie-nekotorykh-vidov-roda-boyaryshnik-crataegus>. Accessed: 25.11.2021. (In Russ.)

REFERENCES

Анализ элементного состава отдельных видов *Sedum (Rhodiola) spp.* и *Orthilia secunda*

И. И. Тернинко, А. В. Лёзина, Ю. Э. Генералова, М. А. Романова*

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

*Контактное лицо: Романова Маргарита Алексеевна. E-mail: romanova.margarita@pharminnotech.com

ORCID: И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>; А. В. Лёзина – <https://orcid.org/0000-0002-4738-8570>; Ю. Э. Генералова – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; М. А. Романова – <https://orcid.org/0000-0003-0225-8294>.

Статья поступила: 06.05.2021

Статья принята в печать: 07.02.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Ортилия однобокая *Orthilia secunda* (L.) House, родиола четырехлепестная *Sedum quadrifidum* Pall. и родиола разнотубчатая *Rhodiola heterodonta* (Hook. f. & Thomson) Boriss. активно используются в народной медицине для лечения гинекологических патологий, однако сырье указанных видов зарегистрировано в качестве БАДов, поскольку отсутствуют данные комплексного фитохимического анализа и критерии стандартизации. Ввиду значимости макро- и микроэлементов для терапии/профилактики гинекологических патологий определение элементного состава лекарственного растительного сырья является важным этапом фитохимического исследования растений с целью введения их в официальную медицину.

Цель. Анализ макро- и микроэлементного состава корневищ и корней р. четырехлепестной, р. разнотубчатой в сравнении с р. розовой и сравнение минерального состава травы ортилии однобокой из трех мест заготовки.

Материалы и методы. Для целей исследования трава ортилии однобокой *Orthilia secunda* (L.) House была заготовлена в трех фитоценологических зонах – южная часть Казахстана (июль 2018 года), Тюменская область (заготовка июль-август 2019 года) и Пермский край (июль 2019 года). Корневища и корни р. розовой были заготовлены в Питомнике СПбХФУ в пос. Лемболово, Ленинградская область (2019 год). ЛРС р. четырехлепестной было приобретено в аптечной сети г. Санкт-Петербурга, место и время заготовки по информации на упаковке – Алтай, март 2019 года. Р. разнотубчатая была заготовлена в Таджикистане (март 2018 года). Анализ элементного состава ЛРС проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС) с индуктивно связанной плазмой на спектрометре Optima 8000 (Perkin Elmer, США) с предварительной пробоподготовкой методом «мокрой» минерализации в соответствии с рекомендациями ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.1.0004.15 и ОФС 1.5.3.0009.15 на базе ЦКП «Аналитический центр». Статистическую обработку результатов проводили при помощи программ Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics (расчет критерия Манна – Уитни) по ОФС.1.1.0013.15.

Результаты и обсуждение. По результатам эксперимента ($P = 95\%$) и расчетам критерия Манна – Уитни (нулевая гипотеза отвергается) установлено, что р. четырехлепестная содержит большее количество натрия, железа, алюминия и марганца в сравнении с другими видами родиол, причем содержание марганца в 3 раза больше, чем в р. розовой, и в 4,9 раз больше, чем в р. разнотубчатой. Р. разнотубчатая отличается большим содержанием кальция, калия и магния. Результаты изучения элементного состава травы ортилии показали, что регион заготовки не оказывает значительного влияния на минеральный профиль растения. Однако в ортилии однобокой, заготовленной в Казахстане, отмечено высокое содержание бария, также незначительно преобладают железо и магний, что может быть связано с техногенным загрязнением почв в данном регионе. Отмечено значительное содержание марганца в траве ортилии (339,0 мг/кг), что выше, чем в сырье родиолы розовой (17,7 мг/кг), которая относится к манганофилам. Это дает возможность отнести ортилию к растениям, избирательно накапливающим марганец, и позиционировать ее как индикатор почв, богатых солями этого элемента. Результаты статистической обработки позволили установить доверительный интервал среднего значения, который характеризует неопределенность результатов анализа и ОКО (RSD), которое характеризует прецизионность полученных результатов. Также путем расчета критерия Манна – Уитни для пула непараметрических данных было установлено, что различия между выборками родиол и ортилий (сравнение выборок внутри рода) являются статистически значимыми. Исключения составляют установленные значения цинка и калия в ортилии однобокой, заготовленной в Казахстане и Пермском крае (нулевая гипотеза принимается, то есть различия между выборками оказались статистически незначимыми), а также количественное содержание марганца в ортилии из Тюменской области и Пермского края.

Заключение. Р. четырехлепестная накапливает максимальное количество элементов в сравнении с фармакопейным видом р. розовой. К мажоритарным микроэлементам растений рода *Rhodiola* относится барий и стронций; р. четырехлепестная позиционируется как манганофил. В траве ортилии значительно преобладает марганец, что также дает возможность отнести ее к манганофилам. Суммарное содержание меди, железа, цинка и кальция в сырье р. разнотубчатой и траве ортилии подтверждает перспективность разработки фитопрепаратов на их основе для лечения и профилактики гинекологических патологий.

Ключевые слова: родиола розовая, родиола четырехлепестная, родиола разнотубчатая, ортилия однобокая, макроэлементы, микроэлементы, атомно-эмиссионная спектроскопия

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы участвовали в планировании и составлении дизайна эксперимента. А. В. Лёзина проводила пробоподготовку всех видов ЛРС для атомно-эмиссионной спектроскопии, участвовала в интерпретации результатов эксперимента и статистической обработке, написании статьи. Ю. Э. Генералова проводила атомно-эмиссионную спектроскопию.

Для цитирования: Тернинко И. И., Лёзина А. В., Генералова Ю. Э., Романова М. А. Анализ элементного состава отдельных видов *Sedum (Rhodiola) spp.* и *Orthilia secunda*. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(1):132–139. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-132-139>

Analysis of the Elemental Composition of Individual Species *Sedum (Rhodiola) spp.* and *Orthilia secunda*

Inna I. Terninko, Alyona V. Lezina, Yulia E. Generalova, Margarita A. Romanova*

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

*Corresponding author: Margarita A. Romanova. E-mail: romanova.margarita@pharminnotech.com

ORCID: Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>; Alyona V. Lezina – <https://orcid.org/0000-0002-4738-8570>; Yulia E. Generalova – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; Margarita A. Romanova – <https://orcid.org/0000-0003-0225-8294>.

Received: 06.05.2021

Revised: 07.02.2022

Published: 25.02.2022

Abstract

Introduction. *Orthilia secunda* (L.) House, *Sedum quadrifidum* Pall., *Rhodiola heterodonta* (Hook. f. & Thomson) Boriss. are actively used in folk medicine for the treatment of gynecological pathologies, however, the raw materials of these species are registered as dietary supplements, since there are no data from complex phytochemical analysis and standardization criteria. Since macro- and microelements are of great importance for the therapy and prevention of gynecological diseases, the determination of the elemental composition of medicinal plant raw materials is an important stage in a comprehensive phytochemical research of these plants with the purpose of introducing them into official medicine.

Aim. Analysis of the macro- and microelement composition of the rhizomes and roots of *Sedum quadrifidum*, *Rhodiola heterodonta* in comparison with *Sedum roseum* and analysis of the mineral composition of the herb *Orthilia secunda* from three harvesting sites.

Materials and methods. For research purposes, the grass of *Orthilia secunda* (L.) House was harvested in three phytocenotic zones – the southern part of Kazakhstan (July 2018), the Tyumen region (harvesting July-August 2019) and the Perm region (July 2019). Rhizomes and roots of *Sedum rosea* were harvested in the SPCPU in the village Lembolovo, Leningrad region (2019). Medicinal plant raw material of *Sedum quadrifidum* was purchased in a pharmacy chain in St. Petersburg, the place and time of procurement according to the information on the package is Altai, March 2019. *Rhodiola heterodonta* was harvested in Tajikistan (March 2018). The analysis was carried out by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (AES) on an Optima 8000 spectrometer (Perkin Elmer, USA) with preliminary sample preparation by the wet mineralization method in accordance with the recommendations of the State Foundation of the Russian Federation XIV OFS1.2.1.1.0004.15 and OFS 1.5. 3.0009.15 on the basis of the Center for Collective Use "Analytical Center". Statistical processing of the results was carried out using the Microsoft Excel program according to GM.1.1.0013.15.

Results and discussion. According to the results of the experiment, it was found that *Sedum quadrifidum* contains a greater amount of sodium, iron, aluminum, and manganese in comparison with other types of Rhodiols, and the content of manganese is 3 times higher than in the *Sedum rosea*, and 4.9 times more than in the *Rhodiola heterodonta*. *Rhodiola heterodonta* is distinguished by a high content of calcium, potassium, and magnesium. The results of studying the elemental composition of *Orthilia* herb showed that the harvesting region does not significantly affect the mineral profile of the plant. However, in *Orthilia secunda* (L.) House harvested in Kazakhstan, a high content of barium is noted, iron, magnesium, manganese, and zinc also slightly prevail, which may be associated with technogenic soil pollution in this region. A significant content of manganese was noted in the herb of *orthilia* (1801.50 mg/kg), which is higher than in the raw material of *rhodiola*, which belongs to manganophiles. This makes it possible to classify *orthilia* as a plant that selectively accumulates manganese, and to position it as an indicator of soils rich in salts of this element. The results of statistical processing made it possible to establish the confidence interval of the mean value, which characterizes the uncertainty of the analysis results and the RSD, which characterizes the precision of the results obtained.

Conclusion. *Sedum quadrifidum* accumulates the maximum number of elements in comparison with *Sedum roseum*. Barium and strontium are the major microelements of the *Rhodiola*. *Sedum quadrifidum* is marketed as a manganophil. In the herb of *Orthilia*, manganese is significantly prevalent, which makes it possible to classify *Orthilia* as a manganophilous species. The total content of copper, iron, zinc and calcium in the raw material of *Rhodiola heterodonta* and *Orthilia secunda* herb confirms the prospects for the development of phytopreparations based on these species of raw materials for the treatment and prevention of gynecological pathologies.

Keywords: *Sedum roseum*, *Sedum quadrifidum*, *Rhodiola heterodonta*, *Orthilia secunda*, macroelements, microelements, atomic emission spectrometry

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. All authors participated in the planning and design of the experiment. Alyona V. Lezina carried out sample preparation of all types of PRM for atomic emission spectroscopy, participated in the interpretation of experimental results and statistical processing, and wrote an article. Yulia E. Generalova performed atomic emission spectroscopy.

For citation: Terninko I. I., Lezina A. V., Generalova Yu. E., Romanova M. A. Analysis of the elemental composition of individual *Species sedum (Rhodiola) spp.* and *Orthilia secunda*. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):132–139. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-132-139>

ВВЕДЕНИЕ

Применение растительных препаратов всегда оставалось в фокусе фармакотерапии отдельных патологических состояний (гинекологических, желудочно-кишечных и др.), а также педиатрической и гериатрической практиках [1]. Так, по данным, полученным немецкими исследователями [2], около 30,1 % пациентов с гинекологическими заболеваниями ис-

пользуют фитотерапию в качестве дополнения к основному лечению [3].

Определение элементного состава лекарственного растительного сырья (ЛРС) является важным этапом комплексного фитохимического исследования, поскольку растения могут избирательно накапливать те или иные макро- и микроэлементы, которые в составе минеральных комплексов с различными био-

логически активными веществами (БАВ) могут переходить в состав лекарственных растительных препаратов и благодаря этому расширять (корректировать, потенцировать и/или изменять) спектр их фармакологических эффектов. Кроме того, элементы имеют собственную фармакологическую активность и оказывают влияние на осуществление ряда физиологических процессов в организме человека.

Участие микро- и макроэлементов в метаболизме связано с построением скелета (кальций, фосфор), поддержанием осмотического давления (натрий, калий), кроветворением (железо, медь) [4]. Многие из них являются активаторами и кофакторами ферментов (магний, медь, железо и др.) [5].

Так, алюминий участвует в процессах регенерации соединительной и эпителиальной ткани, способен влиять на функцию паращитовидных желез [6], однако в высоких концентрациях является токсичным элементом [7]. Железо необходимо для нормального газообмена и функционирования многих ферментов, в том числе каталазы, которая защищает организм от избытка перекиси водорода, продуцирующейся лейкоцитами. Дефицит железа встречается почти у 25 % населения планеты [8]. Женский организм особенно подвержен дефициту железа в виду его физиологических особенностей. Так, например, при беременности дефицит железа [9] может способствовать развитию патологий плода [10] и невынашиванию [11].

Кальций необходим для построения скелетной ткани, сократимости мышечной ткани, а также в комплексе с витамином D участвует в коллагенообразовании, улучшает измененную иммунную реакцию на менструальное кровотечение, что улучшает течение первичной дисменореи [12]. Магний снижает риск развития воспалительных заболеваний органов малого таза, а его дефицит может приводить к нарушению менструального цикла, возникновению патологии вульвы и замедленному заживлению шейки матки после лечения патологических процессов. Биохимическая активность магния способствует профилактике основных акушерских осложнений, таких как плацентарная недостаточность, преэклампсия. Известно, что 70 % плацентарных белков и гормонов женщины являются магнием зависимыми [13].

Медь является компонентом ряда ферментов и важных белков. Симптомы дефицита меди включают нейтропению, анемию, остеопороз, неврологические симптомы [14]. В экспериментах дефицит меди непосредственно приводил к железодефицитной анемии вследствие нарушения абсорбции железа [15].

Цинк также необходим для роста и репродукции [16]. У женщин он играет важную роль в регуляции менструального цикла, в частности, процесс фолликулогенеза связан с антиоксидантными явлениями в клетке и регулируется уровнем цинка. Данный элемент также регулирует все эстрогензависимые процессы, поскольку входит в структуру рецепторов

эстрогенов. Кроме того, пониженный уровень цинка [17] наблюдается в крови женщин, страдающих предменструальным синдромом [18].

Для лечения различных гинекологических патологий в народной медицине активно используется комбинация ортилии однобокой *Orthilia secunda* L. (матка боровая) и родиолы четырехлепестной *Sedum quadrifidum* Pall. – syn. *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & C.A. Mey. (красная щетка).

Ортилия однобокая – это многолетнее травянистое растение, относящееся к семейству Вересковые (*Ericaceae*), которое произрастает в лесах Европы, Западной и Восточной Сибири, Малой и Средней Азии, на севере Монголии и в восточной части Китая. В качестве сырья заготавливают траву. Родиола четырехлепестная (семейство Толстянковые – *Crassulaceae*) районирована на Алтае, в Восточной Сибири и в высокогорных районах Монголии. В качестве сырья заготавливают корневища и корни.

На данный момент применение сырья этих растений ограничивается только БАДами, что обусловлено отсутствием комплексного фитохимического изучения и критериев стандартизации. Данные об элементарном анализе сырья этих видов растений отсутствуют.

Кроме того, интерес представляет сравнительное изучение элементарного профиля родственного р. четырехлепестной вида – р. разнозубчатой *Rhodiola heterodonta* (Hook. f. & Thorns.) Boriss. (syn. *Sedum heterodontum* Hook. f. & Thomson), который географически произрастает в высокогорных районах Средней Азии, на территории Узбекистана, Киргизии и Таджикистана.

Учитывая совокупные данные о популярности этих растений в народной медицине для терапии/профилактики гинекологических заболеваний, значимости элементов для течения этих патологий, а также отсутствие информации об изучении элементарного профиля этих растений, можно говорить об актуальности исследования.

Цель работы – проанализировать макро- и микроэлементный состав корневищ и корней р. четырехлепестной, р. разнозубчатой в сравнении с р. розовой, а также, учитывая влияние эколого-фитоценотических условий места произрастания на элементарный профиль сырья, сравнить минеральный состав травы ортилии однобокой из трех мест заготовки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали корневища и корни р. розовой, заготовленные в Питомнике СПХФУ в (пос. Лемболово, Ленинградская область) в 2019 году, р. четырехлепестной, приобретенные в аптечной сети г. Санкт-Петербурга и, по информации на упаковке, заготовленные на Алтае (март 2019 года), р. разнозубчатой, заготовленной в Таджикистане, в районе горной системы Памиро-Алай (март, 2018 год), и траву ортилии однобокой, заготовленной в Тюменской области (июнь 2019 года), Перм-

ском крае (август 2019 года) и в Казахстане (Северный Казахстан, район Кокшетау, август 2018 года). Сырье высушивали методом естественной воздушно-теневой сушки до характерной ломкости.

Анализ осуществляли методом атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС) с индуктивно связанной плазмой на спектрометре Optima 8000 (PerkinElmer, США) в соответствии с рекомендациями ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.1.0004.15 и ОФС.1.5.3.0009.15 [19]. Испытания проводили с использованием парка оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Статистическую обработку результатов эксперимента осуществляли с помощью программы Microsoft Excel по ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [19]. Устанавливали показатели: среднее значение, дисперсию, стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение и доверительный интервал. Критерий Манна – Уитни рассчитывали с помощью программы IBM SPSS Statistics версия 28.0.0.0 (190).

Пробоподготовка: около 0,4 г (точная навеска) высушенного измельченного (3–5 мм) сырья помещали в сосуд из тефлона, добавляли 5 мл азотной кислоты концентрированной для АЭС (65 % для анализа, с контролируемым содержанием следовых количеств элементов, PanReac, Германия, п. 0001722942, годен до 03.2025) и 3 мл перекиси водорода 30 % (ос.ч. 8-4, ООО «НПФ Химмедсервис», Россия, п. 04, годен до 12.2022), аккуратно перемешивали, оставляли на 10 мин для удаления паров. Затем сосуд герметично закрывали и помещали в микроволновую систему BERGHOF Speed wave Entry Two, устанавливали температурный режим для минерализации растительных объектов (согласно рекомендаций оборудования). После остывания растворы переносили в полимерные мерные колбы (класс точности А) вместимостью 50 мл, доводили до метки водой очищенной деионизированной с электропроводностью менее 0,5 См · см⁻¹.

В качестве стандартных образцов (СО), по растворам которых осуществляли построение калибровочных кривых, использовали Multi-element Calibration Standard 3 с аттестованными значениями концентрации (10 мкг/мл в 5%-й азотной кислоте) элементов (Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Hg, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Ti, Zn, U, V) (PerkinElmer, США, п. CL5-199МКВY1, годен до 30.04.2021) и PurePlusMercury 10 мкг/мл в 5%-й азотной кислоте (PerkinElmer, США, п. CL9-102НGY1, годен до 30.11.2021).

Условия проведения испытания были подобраны исходя из рекомендаций ПО спектрометра и проверены отдельными верификационными испытаниями (специфичность, линейность, сходимос-ть, ПКО): скорость потока плазмообразующего газа – 10 л/мин, дополнительного газа – 0,2 л/мин, скорость потока газа для распыления пробы – 0,7 л/мин; мощность плазмы 1300 Вт, положение обзора эмиссии аксиаль-

ное; скорость подачи раствора – 1,5 мл/мин, для промывки ускоренная подача растворителя 2,5 мл/мин, время задержки – 25 сек., время считывания 0,1–1,0 сек., повторов интегрирования (реплик) – 3.

Спектрометр монохроматический регистрирует интенсивность сигнала и по калибровочной кривой, построенной по растворам СО для каждого конкретного элемента, определяет значение концентрации испытуемого раствора. Содержание элементов (X, мг/кг) в образце рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{C_x \cdot V_1}{m} \cdot 100,$$

где C_x – концентрация элемента по градуировочной кривой, мг/л; V_1 – объем испытуемого раствора, мл; m – масса навески, мг.

В соответствии с рекомендациями ОФС.1.2.1.1.0004.15 каждый испытуемый раствор анализировали в 3 повторностях и проводили 2 параллельных определения каждого анализируемого объекта [19]. Сходимость результатов оценивали по ОКО (RSD) (критерий приемлемости RSD – 2 %, для микроконцентраций допустимо RSD до 30 %).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В корневищах и корнях р. розовой, р. четырехлепестной и р. разнозубчатой, а также ортилии однобокой из трёх мест заготовки было идентифицировано и установлено количество 12 элементов.

Тяжелые металлы и мышьяк (элементы, ПДК которых нормирована в ГФ РФ в ОФС.1.5.3.0009.15) в испытуемых образцах не идентифицированы, следовательно, их содержание меньше предела количественного определения (ПКО) данным методом [19].

По результатам статистической обработки были установлены средние значения для каждого элемента, определен доверительный интервал, который характеризует неопределенность результатов анализа, а также было рассчитано относительное стандартное отклонение (RSD) (таблица 1). Данные, полученные в ходе статистической обработки, не отягощены грубыми ошибками и являются статистически значимыми, что говорит о достоверности полученных результатов.

Результаты анализа элементного профиля сырья трёх видов родиол в сравнительном аспекте, представленные в таблице 1, позволяют сделать вывод, что р. четырехлепестная отличается превалированием большинства микроэлементов в сравнении с другими видами родиол. Так, в р. четырехлепестной содержится в 2 раза больше алюминия, чем в р. разнозубчатой и в 3,4 раза больше, чем в р. розовой, а железа в 3,8 раз и в 2,1 раз больше, чем в р. розовой и р. разнозубчатой соответственно.

Также в р. четырёхлепестной обнаружено высокое содержание натрия и марганца, причем содержание марганца в 3 раза больше, чем в р. розовой, и в 4,9 раз

Таблица 1. Элементный состав сырья трёх видов родиол
Table 1. Elemental composition of raw materials of three species of Rhodiola

Группа Group	Элемент Element	Суточная потребность, мг/день [9, 20] Daily requirement, mg/day [9, 20]	Содержание элементов, мг/кг* (n = 6, P = 95 %) Element content, mg/kg* (n = 6, P = 95 %)		
			Р. розовая, $\bar{x}_{cp.} \pm \Delta x_i$, RSD (%) S. roseum, $\bar{x}_{av.} \pm \Delta x_i$, RSD (%)	Р. четырех-лепестная, $\bar{x}_{cp.} \pm \Delta x_i$, RSD (%) S. quadrifidum, $\bar{x}_{av.} \pm \Delta x_i$, RSD (%)	Р. разно-зубчатая, $\bar{x}_{cp.} \pm \Delta x_i$, RSD (%) R. heterodonta, $\bar{x}_{av.} \pm \Delta x_i$, RSD (%)
Макроэлементы Microelements	Na	500	66,5 ± 2,0 0,47	105,3 ± 11,0*** 1,41	78,6 ± 3,0 0,38
	Ca	1000	3666,0 ± 630,0 2,65	5518,0 ± 89,0* 0,10	6345,0 ± 195,0 0,33
	Mg	400	711,0 ± 75,0 1,71	787,0 ± 148,0 1,68	959,0 ± 11,0 0,20
	K	2500	4416,0 ± 147,0 0,44	3177,0 ± 679,0** 6,06	8131,0 ± 519,0 0,99
Микроэлементы Microelement	Al	40	253,0 ± 81,0 8,56	864,0 ± 58,0*** 0,69	446,0 ± 21,0 0,7
	Fe	18	164,0 ± 45,0 7,97	628,0 ± 62,0*** 0,70	299,0 ± 28,0 1,23
	Ba	Не установлена Not installed	45,9 ± 3,70 1,15	18,70 ± 1,0*** 0,29	24,8 ± 0,2 0,08
	Cu	1,00	2,4 ± 0,50 2,41	3,8 ± 0,90 1,92	2,7 ± 0,1 0,6
	Mn	2,00	17,7 ± 3,7 3,50	52,0 ± 7,0*** 1,08	10,6 ± 0,6 0,76
	Rb	1,00-2,00	6,6 ± 0,5 1,07	2,8 ± 0,6* 3,02	3,3 ± 0,3 0,96
	Sr	0,80-3,00	21,6 ± 4,0 2,02	23,5 ± 1,3 0,69	21,0 ± 0,5 0,30
	Zn	12,00	6,3 ± 1,3 2,15	7,3 ± 0,9** 1,01	13,2 ± 0,3 0,28

Примечание. n – количество вариантов в выборке; $\bar{x}_{cp.} \pm \Delta x_i$ – среднее значение выборки с доверительным интервалом; RSD – относительное стандартное отклонение, %.
* Различия с р. розовой.
**Различия с р. разнозубчатой.
Note. n – is the number of options in the sample, $\bar{x}_{av.} \pm \Delta x_i$ is the mean value of the sample with a confidence interval, RSD is the relative standard deviation, %.
* Differences from r. rosea.
** Differences from r. heterodonta.

больше, чем в р. разнозубчатой. Поэтому можно утверждать, что родиолы (в частности р. четырехлепестная) относятся к манганофилам и могут быть индикаторами почв с высоким содержанием марганца.
В р. разнозубчатой обнаружено в два раза большее количество кальция и калия, чем в других видах родиол, и более высокое содержание магния и цинка.
Данные таблицы 1 представлены в виде диаграмм на рисунках 1 и 2.
Статистическая обработка результатов изучения элементного состава травы ортилии (таблица 2) показала, что несмотря на ряд значимых различий содержания большинства элементов, уровень их накопления однопорядковый. Регион заготовки не оказывает существенного влияния на минеральный профиль растения.

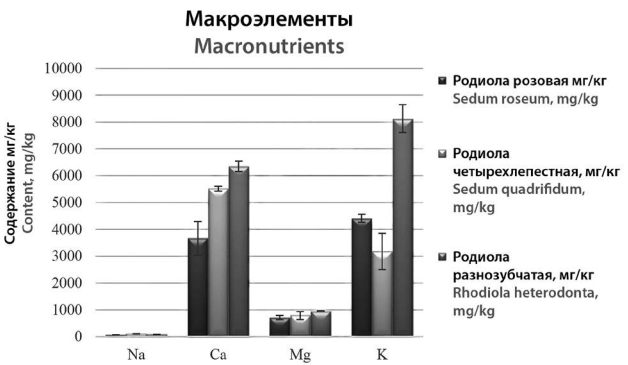


Рисунок 1. Макроэлементный состав сырья трёх видов родиол
Figure 1. Macroelement composition of the raw material of three species of Rhodiola

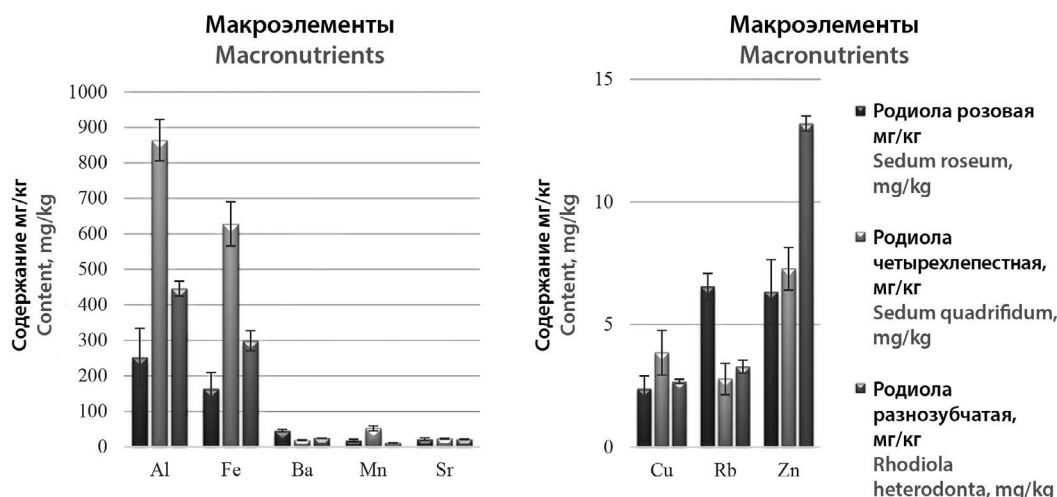


Рисунок 2. Микроэлементный состав сырья трёх видов родиол

Figure 2. Microelement composition of raw materials of three species of Rhodiola

Таблица 2. Элементный состав травы ортилии однобокой из различных регионов заготовки

Table 2. Elemental composition of the herb of *Orthilia secunda* from different regions of the harvest

Группа Group	Элемент Element	Содержание элементов, мг/кг* (n = 6, P = 95 %) Element content, mg/kg* (n = 6, P = 95 %)		
		Ортилия однобокая (Казахстан), $\bar{x} \pm \Delta x$, RSD (%) <i>Orthilia secunda</i> (Kazakhstan), $\bar{x}_{av} \pm \Delta x_r$, RSD (%)	Ортилия однобокая (Пермь), $\bar{x} \pm \Delta x$, RSD (%) <i>Orthilia secunda</i> (Perm), $\bar{x}_{av} \pm \Delta x_r$, RSD (%)	Ортилия однобокая (Тюмень), $\bar{x} \pm \Delta x$, RSD (%) <i>Orthilia secunda</i> (Tyumen), $\bar{x}_{av} \pm \Delta x_r$, RSD (%)
Макроэлемент Macroelement	Na	85,7 ± 0,3 0,05	139,6 ± 17,6 1,33	59,3 ± 4,6 0,82
	Ca	7019,0 ± 63,0 1,88	7685,0 ± 37,0 0,05	6481,0 ± 563,0 0,93
	Mg	1802,0 ± 275,0 1,58	1604,0 ± 1,0 0,01	1586,0 ± 121,0 0,85
	K	12670,0 ± 1938,0 1,60	12265,0 ± 435,0 0,37	10600,0 ± 99,0 0,11
Микроэлементы Microelement	Al	686,0 ± 90,0 1,41	540,0 ± 23,0 0,52	863,0 ± 25,0 0,32
	Fe	127,0 ± 6,0 0,61	98,0 ± 11 1,12	108,0 ± 10,0 0,95
	Ba	111,0 ± 28,0 4,03	62,0 ± 1,0 0,23	81,0 ± 6,0 0,92
	Cu	4,8 ± 0,70 1,74	4,9 ± 0,9 1,92	4,2 ± 0,2 0,55
	Mn	339,0 ± 29,0 8,51	228,0 ± 56,0 3,96	239,0 ± 59,0 3,97
	Rb	3,4 ± 0,2 0,97	5,60 ± 0,3 0,60	3,9 ± 0,1 0,33
	Sr	35,5 ± 7,8 2,32	49,2 ± 1,2 0,40	29,2 ± 2,1 3,72
	Zn	22,50 ± 5,60 5,01	20,80 ± 0,2 0,10	16,4 ± 2,8 1,80

Примечание. n – количество вариантов в выборке; $\bar{x}_{cp} \pm \Delta x_i$ – среднее значение выборки с доверительным интервалом; RSD – относительное стандартное отклонение, %.

Note. n – is the number of options in the sample; $\bar{x}_{av} \pm \Delta x_i$ is the mean value of the sample with a confidence interval, RSD is the relative standard deviation, %.

В ортилии однобокой, заготовленной в Казахстане, обнаруживается более высокое содержание железа, бария, марганца и магния, что может говорить о техногенном загрязнении места заготовки. Содержание марганца в ортилии, независимо от места произрастания, в 10 раз выше, чем в корневищах и корнях родиолы, традиционно относящейся к растениям – манганофилам (рисунки 3, 4) [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты элементного анализа сырья трех видов родиол позволяют сделать заключение о видовом различии макро- и микроэлементного профиля этих растений. Так, р. четырехлепестная отличается избирательным накоплением большинства элементов в сравнении с другими (в т. ч. и фармакопейным) видами и содержит в три раза больше алюминия и железа, а также имеет наибольшую концентрацию натрия и марганца в сравнении с фармакопейным видом – р. розовой.

Полученные данные позволяют гипотетически прогнозировать более выраженное противовоспалительное и регенерирующее действие минеральных комплексов видоспецифичных фенольных соединений р. четырехлепестной необходимых в терапии гинекологических заболеваний в сравнении официальным видом р. розовой.

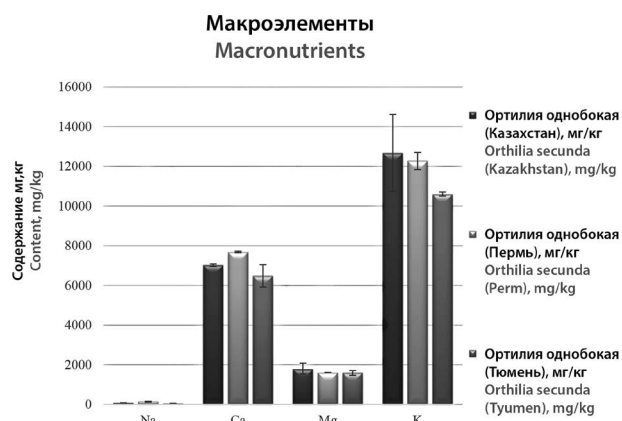


Рисунок 3. Макроэлементный состав сырья ортилии однобокой из трех регионов заготовки

Figure 3. Macroelement composition of raw materials of *Orthilia secunda* from three regions of the harvest

Минеральный профиль травы ортилии не зависит от региона произрастания. Обращает на себя внимание содержание марганца, которое в 10 раз выше аналогичного показателя в корнях с корневищами родиолы, что также дает возможность отнести ортилию к растениям, избирательно накапливающим марганец, и позиционировать ее как индикатор почв, богатых солями этого элемента.

Суммарное содержание таких целевых элементов, как медь, железо, цинк и кальций в сырье р. четырехлепестной и траве ортилии подтверждает перспективность разработки фитопрепаратов на основе данных видов сырья для лечения и профилактики гинекологических патологий.

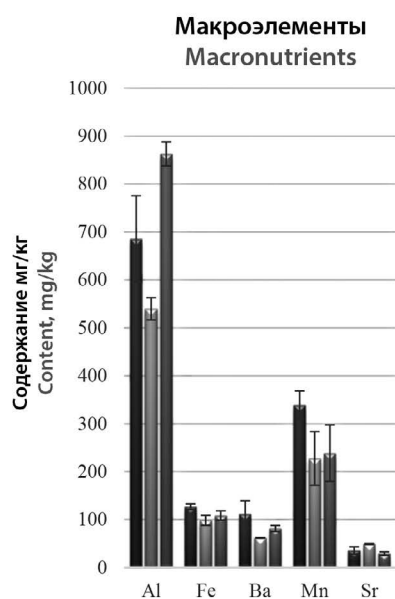
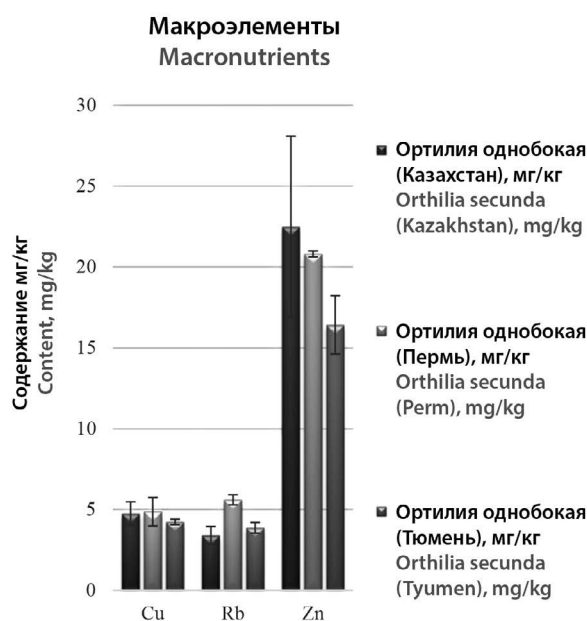


Рисунок 4. Микроэлементный состав сырья ортилии однобокой из трех регионов заготовки

Figure 4. Microelement composition of raw material of *Orthilia secunda* from three regions of the harvest

ЛИТЕРАТУРА

1. Yang M., Lee H. S., Hwang M. W., Jin M. Effects of Korean red ginseng (*Panax Ginseng* Meyer) on bisphenol A exposure and gynecologic complaints: single blind, randomized clinical trial of efficacy and safety. *BMC Complement Altern Med.* 2014;25(14):265. DOI: 10.1186/1472-6882-14-265.
2. Drozdoff L., Klein E., Kiechle M., Paepke D. Use of biologically based complementary medicine in breast and gynecological cancer patients during systemic therapy. *BMC complementary and alternative medicine.* 2018;18(1):1–7. DOI: 10.1186/s12906-018-2325-3.
3. Della Corte L., Noventa M., Ciebiera M., Magliardi M., Sleiman Z., Karaman E., Catena U., Salvaggio C., Falzone G., Garzon S. Phytotherapy in endometriosis: an up-to-date review. *J Complement Integr Med.* 2020;17(3):1–12. DOI: 10.1515/jcim-2019-0084.
4. Cesar G. Fraga. Relevance, essentiality, and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine.* 2005;26:235–244. DOI: 10.1016/j.mam.2005.07.013.
5. Ciosek Z., Kot K., Kosik-Bogacka D., Łanocha-Arendarczyk N., Rotter I. The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue. *Biomolecules.* 2021;11(4):506. DOI: 10.3390/biom11040506.
6. Шугалей И. В., Гарабаджиу А. В., Илюшин М. А., Сударииков А. М. Некоторые аспекты влияния алюминия и его соединений на живые организмы. *Экологическая химия.* 2012;21(3):168–172.
7. Yokel R. A. Aluminum reproductive toxicity: a summary and interpretation of scientific reports. *Critical Reviews in Toxicology.* 2020;50(7):551–593. DOI: 10.1080/10408444.2020.1801575.
8. Румянцев А. Г., Захарова И. Н., Чернов В. М., Тарасова И. С., Заплатников А. Л., Коровина Н. А., Боровик Т. Э., Звонкова Н. Г., Мачнева Е. Б., Лазарева С. И., Васильева Т. М. Распространенность железодефицитных состояний и факторы, на нее влияющие. *Медицинский совет.* 2015;6:62–66. DOI: 10.21518/2079-701X-2015-6-62-66.
9. Keats E. C., Haider B. A., Tam E., Bhutta Z. A. Multiple-micronutrient supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2019;3. DOI: 10.1002/14651858.cd004905.pub6.
10. Абашин С. Ю. Железодефицит у женщин и возможности его коррекции. *Онкогинекология.* 2015;1:63–69.
11. Ендина А. В., Гладили Г. П. Регуляция обмена железа у женщин репродуктивного возраста с доброкачественной патологией



тела матки, осложненной кровотечением. *Фундаментальные исследования*. 2013;7(1):87–90.

12. Геворгян А. П., Сибирская Е. В. Первичная дисменорея с позиции сегодняшнего дня. *Проблемы репродукции*. 2018;24(6):32–38. DOI: 10.17116/repro20182406132.
13. Назаренко Е. Г. Магний и женская репродуктивная система. *Медицинский совет*. 2019;7:119–125. DOI: 10.21518/2079-701X-2019-7-119-125.
14. Ахмеджанова З. И., Жиёмуратова Г. К., Данилова Е. А., Каримов Д. А. Макро- и микроэлементы в жизнедеятельности организма и их взаимосвязь с иммунной системой (обзор литературы). *Журнал теоретической и клинической медицины*. 2020;1:16–21.
15. Громова О. А., Торшин И. Ю., Хаджидис А. К. Анализ молекулярных механизмов воздействия железа (II), меди, марганца в патогенезе железодефицитной анемии. *Клиническая фармакология и фармакоэкономика*. 2010;1:1–9.
16. Prasad A. S. Zinc in Human Health: Effect of Zinc on Immune Cells. *Molecular Medicine*. 2008;14(5–6):353–357. DOI: 10.2119/2008-00033.
17. Олина А. А., Садыкова Г. К. Значение дефицита цинка в формировании нарушений репродуктивного здоровья (обзор литературы). *Пермский медицинский журнал*. 2015;32(5):138–143. DOI: 10.17816/pmj325138-143.
18. Ayana G., Moges T., Samuel A. Dietary zinc intake and its determinants among Ethiopian children 6–35 months of age. *BMC Nutrition*. 2018;4(30):1–6. DOI: 10.1186/s40795-018-0237-8.
19. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание: официальный текст. М.: Федеральная электронная медицинская библиотека; 2018. Доступно по: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Ссылка активна на 30.03.2021.
20. Коденцова В. М. Витамины и минералы как фактор предупреждения дефектов развития плода и осложнений беременности. *Медицинский совет*. 2016;9:106–114. DOI: 10.21518/2079-701X-2016-9-106-114.
21. Куркин В. А. Родиола розовая (золотой корень): стандартизация и создание лекарственных препаратов: монография. Самара: ООО «Офорт»; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России; 2015. 240 с.
9. Keats E. C., Haider B. A., Tam E., Bhutta Z. A. Multiple-micronutrient supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019;3. DOI: 10.1002/14651858.cd004905.pub6.
10. Abashin S. Yu. Iron deficiency in women and the possibility of its correction. *Onkoginekologiya*. 2015;1:63–69. (In Russ.)
11. Endina A. V., Gladilin G. P. Regulation of iron metabolism in women of reproductive age with benign pathology of the uterine body complicated by bleeding. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental research*. 2013;7(1):87–90. (In Russ.)
12. Gevorgyan A. P., Sibirskaya E. V. Primary dysmenorrhea from the position of today. *Problemy reproduktivnoy = Russian Journal of Human Reproduction*. 2018;24(6):32–38. DOI: 10.17116/repro20182406132. (In Russ.)
13. Nazarenko E. G. Magnesium and the female reproductive system. *Medsitskiy sovet = Medical Council*. 2019;7:119–125. DOI: 10.21518/2079-701X-2019-7-119-125. (In Russ.)
14. Akhmedzhanova Z. I., Zhiemuratova G. K., Danilova E. A., Karimov D. A. Macro- and microelements in the life of the body and their relationship with the immune system (literature review). *Zhurnal teoreticheskoy i klinicheskoy meditsiny*. 2020;1:16–21. (In Russ.)
15. Gromova O. A., Torshin I. Yu., Khadzhdidis A. K. Analysis of the molecular mechanisms of the effect of iron (II), copper, manganese in the pathogenesis of iron deficiency anemia. *Klinicheskaya farmakologiya i farmakoeconomika*. 2010;1:1–9. (In Russ.)
16. Prasad A. S. Zinc in Human Health: Effect of Zinc on Immune Cells. *Molecular Medicine*. 2008;14(5–6):353–357. DOI: 10.2119/2008-00033.
17. Olina A. A., Sadykova G. K. The importance of zinc deficiency in the formation of reproductive health disorders (literature review). *Permskiy meditsinskiy zhurnal = Perm Medical Journal*. 2015;32(5):138–143. (In Russ.) DOI: 10.17816/pmj325138-143.
18. Ayana G., Moges T., Samuel A. Dietary zinc intake and its determinants among Ethiopian children 6–35 months of age. *BMC Nutrition*. 2018;4(30):1–6. DOI: 10.1186/s40795-018-0237-8.
19. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XIV izdanie: ofitsial'nyy tekst [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition: official text]. Moscow: Federal'naya elektronnyaya medicinskaya biblioteka; 2018. Available at: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Accessed: 30.03.2021. (In Russ.)
20. Kodentsova V. M. Vitamins and minerals as a factor in the prevention of fetal developmental defects and pregnancy complications. *Medsitskiy sovet = Medical Council*. 2016;9:106–114. DOI: 10.21518/2079-701X-2016-9-106-114. (In Russ.)
21. Kurkin V. A. *Rodiola rozovaya (zolotoy koren'): standartizatsiya i sozдание lekarstvennykh preparatov: monografiya* [Rhodiolarosea (golden root) standardization and establishment of drugs: monograph]. Samara: ООО «Офорт»; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России; 2015. 240 p. (In Russ.)

REFERENCES

1. Yang M., Lee H. S., Hwang M. W., Jin M. Effects of Korean red ginseng (Panax Ginseng Meyer) on bisphenol A exposure and gynecologic complaints: single blind, randomized clinical trial of efficacy and safety. *BMC Complement Altern Med*. 2014;25(14):265. DOI: 10.1186/1472-6882-14-265.
2. Drozdoff L., Klein E., Kiechle M., Paepke D. Use of biologically based complementary medicine in breast and gynecological cancer patients during systemic therapy. *BMC complementary and alternative medicine*. 2018;18(1):1–7. DOI: 10.1186/s12906-018-2325-3.
3. Della Corte L., Noventa M., Ciebiera M., Magliarditi M., Sleiman Z., Karaman E., Catena U., Salvaggio C., Falzone G., Garzon S. Phytotherapy in endometriosis: an up-to-date review. *J Complement Integr Med*. 2020;17(3):1–12. DOI: 10.1515/jcim-2019-0084.
4. Cesar G. Fraga. Relevance, essentiality, and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine*. 2005;26:235–244. DOI: 10.1016/j.mam.2005.07.013.
5. Ciosek Z., Kot K., Kosik-Bogacka D., Łanocha-Arendarczyk N., Rotter I. The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue. *Biomolecules*. 2021;11(4):506. DOI: 10.3390/biom11040506.
6. Shugaley I. V., Garabadzhiu A. V., Ilyushin M. A., Sudarikov A. M. Some aspects of the influence of aluminum and its compounds on living organisms. *Ekologicheskaya khimiya*. 2012;21(3):168–172. (In Russ.)
7. Yokel R. A. Aluminum reproductive toxicity: a summary and interpretation of scientific reports. *Critical Reviews in Toxicology*. 2020;50(7):551–593. DOI: 10.1080/10408444.2020.1801575.
8. Rumyantsev A. G., Zakharova I. N., Chernov V. M., Tarasova I. S., Zaplatnikov A. L., Korovina N. A., Borovik T. E., Zvonkova N. G., Machneva E. B., Lazareva S. I., Vasil'eva T. M. The prevalence of iron deficiency states and factors affecting it. *Medsitskiy sovet = Medical Council*. 2015;6:62–66. DOI: 10.21518/2079-701X-2015-6-62-66. (In Russ.)

Изучение фармакокинетики пролонгированного антиаритмического препарата лаппаконитина гидробромида (Аллафорте®, АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия)

О. А. Арчакова^{1*}, Н. С. Багаева¹, Т. Н. Комаров^{1,2}, А. В. Рогов³, Д. С. Щелгачева¹,
А. В. Суворова¹, П. К. Карнакова^{1,4}, П. А. Карпова^{1,4}, И. Е. Шохин^{1,2}

¹ ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ), 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

³ АО «Фармцентр ВИЛАР», 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 29

⁴ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

* Контактное лицо: Ольга А. Арчакова. E-mail: o.archakova@cpha.ru

ORCID: О. А. Арчакова – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Н. С. Багаева – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;

Т. Н. Комаров – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; А. В. Рогов – <https://orcid.org/0000-0001-8791-1971>; Д. С. Щелгачева – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>;

А. В. Суворова – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>; П. К. Карнакова – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>; П. А. Карпова – <https://orcid.org/0000-0001-6777-5976>;

И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 14.12.2021

Статья принята в печать: 04.02.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Аллафорте® (АО «Фармцентр ВИЛАР») – отечественный антиаритмический лекарственный препарат, обладающий пролонгированным действием. По сравнению с аналогичными препаратами, зарегистрированными на территории Российской Федерации, лекарственная форма препарата Аллафорте® обеспечивает уменьшение кратности приема лекарственного препарата, а также снижает риск развития побочных эффектов, что является актуальным при приеме антиаритмических препаратов класса IC. Однако фармакокинетика данного препарата не была ранее изучена на людях, что привело к необходимости ее полноценного изучения для обеспечения максимальной эффективности и безопасности терапии аритмии.

Цель. Целью исследования является изучение фармакокинетики лекарственного препарата Аллафорте®, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия).

Материалы и методы. Концентрации лаппаконитина и его активного метаболита N-деацетиллаппаконитина в плазме крови здоровых добровольцев определялись методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Фармакокинетические параметры вычислены с помощью программного обеспечения R Project 3.5.1 (расширение «bea», версия 2.8.3-2), разработчики Hsin-ya Lee и Yung-jin Lee, Тайвань.

Результаты и обсуждение. Рассчитаны основные фармакокинетические параметры лаппаконитина и N-деацетиллаппаконитина, а также построены усредненные фармакокинетические профили (в линейных и полулогарифмических координатах) лаппаконитина и его метаболита N-деацетиллаппаконитина после однократного приема исследуемого препарата. Средние значения максимальных концентраций (C_{max}), определяемых в плазме крови добровольцев после приема исследуемого препарата Аллафорте®, составляют $5,09 \pm 4,07$ нг/мл для лаппаконитина и $11,66 \pm 6,21$ нг/мл для N-деацетиллаппаконитина (Mean $\pm$ SD). Время достижения максимальных концентраций лаппаконитина и N-деацетиллаппаконитина (T_{max}) составляет $4,43 \pm 3,54$ часа и $4,04 \pm 2,18$ часа соответственно. Средние значения площадей под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}) и площади под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) исследуемого препарата Аллафорте® составляют $42,96 \pm 34,48$ нг · ч/мл и $71,24 \pm 43,20$ нг · ч/мл соответственно (лаппаконитин); $167,42 \pm 114,41$ нг · ч/мл и $189,42 \pm 115,20$ нг · ч/мл, соответственно (N-деацетиллаппаконитин). Исследуемый препарат элиминировался из плазмы крови со средними значениями периода полувыведения ($T_{1/2}$) $8,45 \pm 5,10$ часа для лаппаконитина и $9,04 \pm 2,57$ часа для N-деацетиллаппаконитина.

Заключение. Проведено изучение фармакокинетики препарата Аллафорте®, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР») при однократном применении с участием здоровых добровольцев. Полученные данные позволяют обеспечить проведение эффективной терапии аритмии исследуемым препаратом, минимизировав вероятность возникновения побочных эффектов.

Ключевые слова: лаппаконитин, N-деацетиллаппаконитин, Аллафорте®, плазма, фармакокинетика, аритмия

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева, А. В. Суворова, П. К. Карнакова и П. А. Карпова участвовали в проведении аналитического этапа исследования. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. А. В. Рогов и И. Е. Шохин отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Арчакова О. А., Багаева Н. С., Комаров Т. Н., Рогов А. В., Щелгачева Д. С., Суворова А. В., Карнакова П. К., Карпова П. А., Шохин И. Е. Изучение фармакокинетики пролонгированного антиаритмического препарата лаппаконитина гидробромида (Аллафорте®, АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия). Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(1):140–147. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-140-147>

Pharmacokinetics Study of the Long-acting Antiarrhythmic Drug of Lappaconitine Hydrobromide (Allaforte®, JSC "Pharmcenter VILAR", Russia)

Olga A. Archakova^{1*}, Natalia S. Bagaeva¹, Timofey N. Komarov^{1,2}, Anton V. Rogov³,
Dana S. Shchelgacheva¹, Alexandra V. Suvorova¹, Polina K. Karnakova^{1,4}, Polina A. Karpova^{1,4},
Igor E. Shohin^{1,2}

¹ LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

² National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia

³ JSC "Pharmcenter VILAR", 7/29, Grina str., Moscow, 117216, Russia

⁴ I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Olga A. Archakova. E-mail: o.archakova@cpha.ru

ORCID: Olga A. Archakova – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Natalia S. Bagaeva – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;

Timofey N. Komarov – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; Anton V. Rogov – <https://orcid.org/0000-0001-8791-1971>;

Dana S. Shchegacheva – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>; Alexandra V. Suvorova – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>;

Polina K. Karnakova – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>; Polina A. Karpova – <https://orcid.org/0000-0001-6777-5976>; Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 14.12.2021

Revised: 04.02.2022

Published: 25.02.2022

Abstract

Introduction. Allaforte® (JSC "Pharmcenter VILAR", Russia) is an antiarrhythmic long-acting drug. The dosage form of the drug Allaforte® provides a decrease in the frequency of taking the drug and also reduces the risk of side effects. It is relevant when taking antiarrhythmic drugs of the IC class. However, the pharmacokinetics of this drug has not been studied on humans. Therefore, it is important to fully study the pharmacokinetics to ensure the maximum efficacy and safety of arrhythmia therapy.

Aim. The aim is pharmacokinetics study of long-acting antiarrhythmic drug Allaforte® (JSC "Pharmcenter VILAR", Russia), 25 mg.

Materials and methods. Concentration of lappaconitine and its active metabolite N-desacetylappaconitine in human plasma determinates by high performance liquid chromatography with tandem mass-spectrometry. Pharmacokinetic parameters calculated by R Project 3.5.1 software (package «bear», version 2.8.3-2), originally created by Hsin-ya Lee and Yung-jin Lee, Taiwan.

Results and discussion. Pharmacokinetic parameters of lappaconitine and N-desacetylappaconitine were calculated. Averaged pharmacokinetic profiles (in linear and semi-log scale) of lappaconitine and N-desacetylappaconitine after single administration under fasting were built. The means of the maximum concentrations (C_{max}) determined in the blood plasma of volunteers after single administration Allaforte® are 5.09 ± 4.07 ng/ml for lappaconitine and 11.66 ± 6.21 ng/ml for N-deacetylappaconitine (Mean $\pm$ SD). The peak time of the maximum concentrations (T_{max}) is 4.43 ± 3.54 hours for lappaconitine and 4.04 ± 2.18 hours for N-deacetylappaconitine. The means of the areas under the curve plasma concentration – time from 0 to 48 hours (AUC_{0-48}) and under the curve plasma concentration–time from zero to infinity ($AUC_{0-\infty}$) of Allaforte® is 42.96 ± 34.48 ng · h/ml and 71.24 ± 43.20 ng · h/ml for lappaconitine; 167.42 ± 114.41 ng · h/ml and 189.42 ± 115.20 ng · h/ml for N-deacetylappaconitine. Allaforte® was eliminated from blood plasma with means of terminal half-life ($T_{1/2}$) 8.45 ± 5.10 hours for lappaconitine and 9.04 ± 2.57 hours for N-deacetylappaconitine.

Conclusion. Pharmacokinetics study of long-acting antiarrhythmic drug Allaforte® (JSC "Pharmcenter VILAR", Russia) after single administration was researched. Results of the study allows to conduct an effective therapy of arrhythmia by study drug and minimize side effects.

Keywords: lappaconitine, N-desacetylappaconitine, Allaforte®, plasma, pharmacokinetics, arrhythmia

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Dana S. Shchegacheva, Alexandra V. Suvorova, Polina K. Karnakova and Polina A. Karpova participated in the analytical phase of the study. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results. Anton V. Rogov and Igor E. Shohin 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: Archakova O. A., Bagaeva N. S., Komarov T. N., Rogov A. V., Shchegacheva D. S., Suvorova A. V., Karnakova P. K., Karpova P. A., Shohin I. E. Pharmacokinetics Study of the Long-acting Antiarrhythmic Drug of Lappaconitine Hydrobromide (Allaforte®, JSC "Pharmcenter VILAR", Russia). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):140–147. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-140-147>

ВВЕДЕНИЕ

Лечение и профилактика аритмий является одной из важных проблем современной кардиологии. В большинстве случаев причиной смертности являются фибрилляции предсердий (ФП), наиболее часто развивающихся как осложнения ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда [1]. Более чем у 33 миллионов человек в мире выявлена фибрилляция предсердий, при этом ежегодно количество новых случаев регистрируется более чем у 5 миллионов человек. Прогнозируется удвоение заболеваемости фибрилляцией предсердий в течение следующих 20 лет, что составит к концу 2040 года в одной только Европе от 120 000 до 215 000 новых случаев в год [2, 3].

Несмотря на активно внедряющиеся в медицинскую практику хирургические методы лечения аритмий, медикаментозное лечение остается на первом месте [4]. Однако в процессе применения антиаритмических препаратов существует высокая вероятность развития тяжелых кардиальных и некардиаль-

ных побочных эффектов [2, 5, 6], частота возникновения которых пропорциональна дозе и длительности приема данных препаратов. В большинстве случаев это является причиной прекращения терапии аритмий [2]. Поэтому в настоящее время разработка эффективных и безопасных препаратов для лечения аритмий сердца является актуальной задачей здравоохранения [7].

На территории Российской Федерации уже много лет для лечения наджелудочковых и желудочковых аритмий применяются препараты лаппаконитина [8], антиаритмическая эффективность которых достигает 90 % в течение первых трех месяцев наблюдений, а к концу первого года они позволяют сохранить сердечный ритм в 57 % случаев при относительно хорошей переносимости [9]. Согласно статистике, для контроля ритма сердца препараты лаппаконитина назначаются в следующих случаях:

- в 8,9 % случаев как препарат 1-й линии пациентам без органического заболевания сердца или с минимальными структурными изменениями;

- в 19,7 % случаев как препарат 2-й линии пациентам без органического заболевания сердца или с минимальными структурными изменениями;
- в 1,8 % случаев как препарат 1-й линии при лечении пароксизмальной и персистирующей ФП у пациентов с органическим заболеванием сердца в отсутствие клинически значимой хронической сердечной недостаточности (ХСН);
- в 4,0 % случаев как препарат 2-й линии при лечении пароксизмальной и персистирующей ФП у пациентов с органическим заболеванием сердца в отсутствие клинически значимой ХСН;
- в 5,2 % случаев после изоляции устьев легочных вен [10].

Несмотря на свою высокую эффективность, препараты лаппаконитина имеют некоторые ограничения в применении пациентами [8] в связи с высокой токсичностью [11] и риском возникновения проаритмогенных [9], а также некардиальных побочных эффектов в виде головокружения, головной боли, нарушения координации движений и диплопии [12–15]. Все эти побочные явления напрямую зависят от дозы препарата, усиливаясь при ее увеличении, что определяет в ряде случаев невозможность достижения антиаритмического эффекта препарата, также зависящего от дозы [12].

В связи с этим компанией АО «Фармцентр ВИЛАР» был зарегистрирован препарат на основе лаппаконитина гидробромида Аллафорте®, пролонгированная форма которого способствует снижению риска развития нежелательных явлений лаппаконитина гидробромида и уменьшению кратности приема препарата [12, 16]. В качестве сырья для производства антиаритмического препарата Аллафорте® используются надземная часть аконита белоустого (*Aconitum leucostomum* Worosch.) и корневища с корнями аконита северного (*Aconitum septentrionale* Koelle) семейства лютиковые (*Ranunculaceae*) [17–19].

В процессе проведения дорегистрационных исследований препарата Аллафорте® не проводилось изучение фармакокинетики на людях, что может привести к ошибкам дозирования лекарственного препарата, и, как следствие, к возникновению нежелательных реакций. Поэтому было проведено пострегистрационное исследование фармакокинетики препарата Аллафорте® на здоровых добровольцах для обеспечения максимальной эффективности и безопасности терапии аритмий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинический и аналитический этапы исследования фармакокинетики препарата Аллафорте®, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия), а также статистическая обработка данных проводились в рамках исследования сравнительной фармакокинетики препарата Аллафорте®, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР», Россия) и аналогичного препарата отечественного производителя.

Клинический этап исследования

В исследовании принимали участие здоровые добровольцы мужского и женского пола в возрасте от 18 до 45 лет включительно.

Добровольцам устанавливался кубитальный гепаринизированный катетер на 12 часов. После установки катетера за 5–10 минут до приема препарата отбиралась исходная (0) проба крови. Под наблюдением специалистов добровольцы однократно принимали исследуемый препарат в дозе 25 мг (1 таблетка утром натощак, запивая 200 мл столовой воды (без газа). Дальнейший отбор проб крови для изучения фармакокинетики проводился через 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 ч; 80 мин; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 7, 8; 12; 24 и 48 часов после приема исследуемого препарата.

Далее отобранные образцы крови центрифугировали и затем отбирали плазму крови в отдельные промаркированные пробирки, содержащие K_2EDTA в качестве антикоагулянта. Все образцы плазмы крови замораживали, хранили и транспортировали в аналитическую лабораторию при температуре не выше минус 20 °С.

Аналитический этап исследования

Концентрации лаппаконитина и его активного метаболита N-деацетиллаппаконитина в плазме крови здоровых добровольцев определялись методом высокочувствительной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием электроспрея в качестве источника ионизации. В качестве внутреннего стандарта был использован тримебутин. Детектирование лаппаконитина, N-деацетиллаппаконитина и внутреннего стандарта тримебутина проводилось в режиме мониторинга множественных реакций. В качестве подвижной фазы использовались 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде с прибавлением 0,08 % аммиака (по объёму) и 0,1 % раствор муравьиной кислоты в метаноле с прибавлением 0,08 % аммиака. Анализ проводился в градиентном режиме элюирования с использованием хроматографической колонки YMC-Pack Pro C18, 100 × 2,0 мм, 3 мкм. Аналитические диапазоны составляли 0,50–50,00 нг/мл для лаппаконитина и 0,50–100,00 нг/мл для N-деацетиллаппаконитина [20].

Статистическая обработка данных

Фармакокинетические профили изменения значений концентраций лаппаконитина и его метаболита N-деацетиллаппаконитина в плазме крови человека во времени, зарегистрированные после приема препарата Аллафорте®, характеризовались максимальной концентрацией лекарственного вещества (C_{max}) и временем ее достижения (T_{max}), площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}), рас-

считанной линейно-логарифмическим методом трапеций, площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$). Дополнительно определяли следующие фармакокинетические параметры: период полувыведения ($T_{1/2}$), константа скорости элиминации (K_{el}), оцениваемая по угловому коэффициенту линии регрессии, рассчитанного по методу наименьших квадратов, натуральной логарифмической концентрации по отношению ко времени получения последних значений концентрации (не менее трех) выше нижнего предела количественного определения.

Фармакокинетические параметры вычислены с помощью программного обеспечения R Project 3.5.1 (расширение «bea», версия 2.8.3-2), разработчики Hsin-ya Lee и Yung-jin Lee, Тайвань. Распределение фармакокинетических параметров описано мерами центральной тенденции (среднее арифметическое, среднее геометрическое, медиана) и мерой разброса данных (стандартное отклонение).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фармакокинетические параметры лаппаконитина. Среднее значение максимальных концентраций (C_{max}), определяемых в плазме крови добровольцев после приема исследуемого препарата Аллафорте®, составляет $5,09 \pm 4,07$ нг/мл (Mean $\pm$ SD). Время достижения максимальной концентрации лаппаконитина (T_{max}) составляет $4,43 \pm 3,54$ часа. Средние значения площади под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}) и площади под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) исследуемого препарата Аллафорте® составляют $42,96 \pm 34,48$ нг · ч/мл и $71,24 \pm 43,20$ нг · ч/мл, соответственно. Исследуемый препарат элиминировался из плазмы крови со средним значением периода полувыведения ($T_{1/2}$) $8,45 \pm 5,10$ часа (таблица 1).

Фармакокинетические параметры N-дезацетиллаппаконитина. Среднее значение максимальных концентраций (C_{max}), определяемых в плазме крови добровольцев после приема исследуемого препарата Аллафорте®, составляет $11,66 \pm 6,21$ нг/мл (Mean $\pm$ SD). Время достижения максимальной концентрации N-дезацетиллаппаконитина (T_{max}) составляет $4,04 \pm 2,18$ часа. Средние значения площади под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}) и площади под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) исследуемого препарата Аллафорте® составляют $167,42 \pm 114,41$ нг · ч/мл и $189,42 \pm 115,20$ нг · ч/мл, соответственно. Исследуемый препарат элиминиро-

вался из плазмы крови со средним значением периода полувыведения ($T_{1/2}$) $9,04 \pm 2,57$ часа (таблица 1).

Усредненные фармакокинетические профили (в линейных и полулогарифмических координатах) лаппаконитина и его метаболита N-дезацетиллаппаконитина после приема исследуемого препарата приведены на рисунках 1 и 2.

Таблица 1. Сводная таблица фармакокинетических параметров лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина после однократного приема натощак исследуемого препарата Аллафорте®

Table 1. Summary data of pharmacokinetic parameters of lappaconitine and N-desacetylappaconitine after a single administration under fasting of Allaforte®

Фармакокинетический параметр Pharmacokinetic parameter	Лаппаконитин Lappaconitine	N-дезацетиллаппаконитин N-desacetylappaconitine
C_{max} нг/мл C_{max} ng/ml		
Количество добровольцев Number of volunteers	28	28
Среднее арифметическое Mean	5,09	11,66
Среднее геометрическое Geometric Mean	4,06	10,29
Медиана Median	3,60	9,88
Стандартное отклонение SD	4,07	6,21
AUC_{0-t} нг · ч/мл AUC_{0-t} ng · h/ml		
Количество добровольцев Number of volunteers	28	28
Среднее арифметическое Mean	42,96	167,42
Среднее геометрическое Geometric Mean	33,18	138,59
Медиана Median	26,64	133,28
Стандартное отклонение SD	34,48	114,41
$AUC_{0-\infty}$ нг · ч/мл $AUC_{0-\infty}$ ng · h/ml		
Количество добровольцев Number of volunteers	22	26
Среднее арифметическое Mean	71,24	189,42
Среднее геометрическое Geometric Mean	58,42	158,35
Медиана Median	57,98	154,35
Стандартное отклонение SD	43,20	125,20

Фармакокинетический параметр Pharmacokinetic parameter	Лаппаконитин Lappaconitine	N-дезацетиллаппаконитин N-desacetylappaconitine
T_{max} , ч T_{max} , h		
Количество добровольцев Number of volunteers	28	28
Среднее арифметическое Mean	4,43	4,04
Среднее геометрическое Geometric Mean	3,37	3,62
Медиана Median	2,75	4,00
Стандартное отклонение SD	3,54	2,18
K_{el} , ч ⁻¹ K_{el} , h ⁻¹		
Количество добровольцев Number of volunteers	22	26
Среднее арифметическое Mean	0,114	0,083
Среднее геометрическое Geometric Mean	0,097	0,080
Медиана Median	0,085	0,079
Стандартное отклонение SD	0,066	0,024
$T_{1/2}$, ч $T_{1/2}$, h		
Количество добровольцев Number of volunteers	22	26
Среднее арифметическое Mean	8,45	9,04
Среднее геометрическое Geometric Mean	7,17	8,70
Медиана Median	8,30	8,77
Стандартное отклонение SD	5,10	2,57

Примечание. AUC – площадь под фармакокинетической кривой; SD – стандартное отклонение.

Note. AUC – area under the pharmacokinetic curve; SD – standard deviation.

На рисунках 1 и 2 мы видим, что препарат Аллафорте® предположительно имеет двухфазную кинетику элиминации лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина, однако это может быть связано с высокой вариабельностью значений T_{max} лаппаконитина [coefficient of variation (CV) = 79,84 %] и N-дезацетиллаппаконитина (CV = 53,94 %), а также большим разбросом индивидуальных значений (от 0,75 часов до 12 часов для лаппаконитина; от 1,5 часов до 12 часов для N-дезацетиллаппаконитина).

Также можно отметить, что при приеме препарата Аллафорте® отсутствуют существенные различия в T_{max} лаппаконитина и T_{max} N-дезацетиллаппаконитина (критерий Вилкоксона, $p > 0,05$). Это может приводить к усилению терапевтического эффекта в момент достижения максимальных концентраций лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина в плазме крови пациентов.

Площадь под фармакокинетической кривой N-дезацетиллаппаконитина в 3,9 раза выше, чем у лаппаконитина, что позволяет предположить низкую вероятность возникновения нежелательных лекарственных явлений, поскольку N-дезацетиллаппаконитин обладает низкой токсичностью по сравнению с лаппаконитином [21].

Также Аллафорте® по сравнению с аналогичными препаратами, зарегистрированными на территории Российской Федерации, имеет более длительные время достижения максимальной концентрации в крови ($4,43 \pm 3,54$ часа) и период полувыведения лаппаконитина ($8,45 \pm 5,10$ часа). Для сравнения T_{max} и $T_{1/2}$ лаппаконитина, входящего в состав препарата Аллапинин®, составляют 1,5 часа и 1,17–2,4 часа соответственно [21]. Следовательно, применение препарата Аллафорте® может снизить кратность дозирования.

Полученные результаты исследования фармакокинетики необходимо сопоставить с исследованиями фармакодинамики, что позволит скорректировать режим дозирования препарата Аллафорте® [22]. Однако значения периода полувыведения лаппаконитина из полученных нами данных варьировались от 2,71 до 22,74 часов (CV = 60,39 %), поэтому необходимо обеспечить индивидуальный подход к выбору режима дозирования и при возможности проводить терапевтический лекарственный мониторинг при приеме препарата Аллафорте® для обеспечения эффективной и безопасной терапии аритмий [23–26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено изучение фармакокинетики препарата Аллафорте®, таблетки пролонгированного действия 25 мг (АО «Фармцентр ВИЛАР») при однократном применении с участием здоровых добровольцев. По полученным в ходе аналитического этапа исследования концентрациям лаппаконитина и его активного метаболита N-дезацетиллаппаконитина были рассчитаны основные фармакокинетические параметры, а также построены усредненные фармакокинетические профили (в линейных и полулогарифмических координатах) исследуемых веществ после однократного приема пролонгированного препарата Аллафорте®. Полученные данные позволяют обеспечить проведение эффективной терапии аритмий исследуемым препаратом, минимизировав вероятность возникновения побочных эффектов.

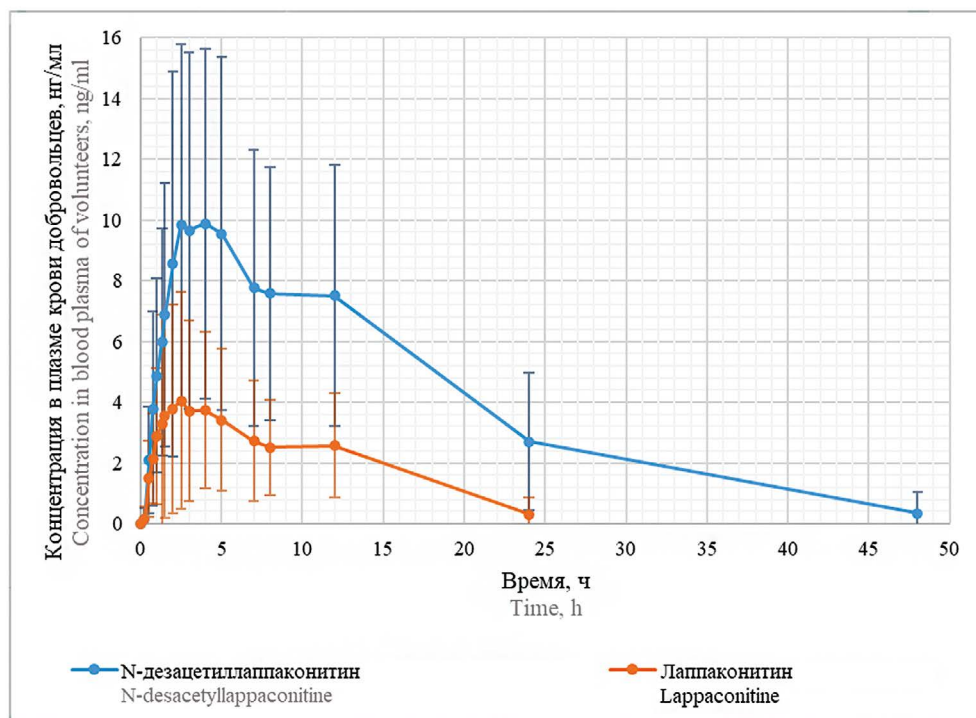


Рисунок 1. Усредненные фармакокинетические профили (в линейных координатах со стандартными отклонениями) лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина после однократного приема исследуемого препарата Аллафорте®, 25 мг

Figure 1. Average pharmacokinetic profiles (in linear scale with standard deviations) of lappaconitine and N-desacetylappaconitine after single administration under fasting of Allafortе®, 25 mg

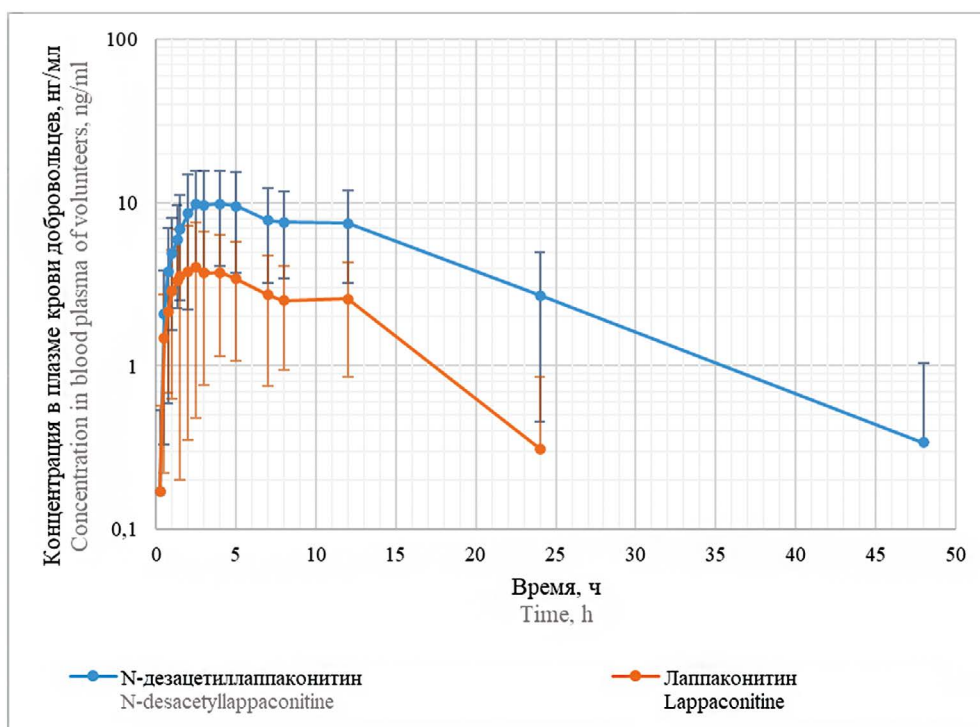


Рисунок 2. Усредненные фармакокинетические профили (в полулогарифмических координатах со стандартными отклонениями) лаппаконитина и N-дезацетиллаппаконитина после однократного приема исследуемого препарата Аллафорте®, 25 мг

Figure 2. Average pharmacokinetic profiles (in semi-log scale with standard deviations) of lappaconitine and N-desacetylappaconitine after single administration under fasting of Allafortе®, 25 mg

ЛИТЕРАТУРА

1. Рыбакова Т. А., Столярова В. В., Назаркина М. Г., Лещанкина Н. Ю. Анализ результатов пятилетнего наблюдения за больными с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий, получающими профилактическую антиаритмическую терапию. *Российский кардиологический журнал*. 2018;7:67–72. DOI: 10.15829/1560-4071-2018-7-67-72.
2. Галюева Д. А., Миронов Н. Ю., Лайович Л. Ю., Миронова Н. А., Голицын С. П. Взаимосвязь фибрилляции предсердий и хронической сердечной недостаточности. Современные подходы к лечению. *Кардиологический вестник*. 2021;16(2):5–14. DOI: 10.17116/Cardiobulletin2021160215.
3. Shkolnikova M. A., Jdanov D. A., Ildarova R. A., Shcherbakova N. V., Polyakova E. B., Mikhaylov E. N., Shalnova S. A., Shkolnikov V. M. Atrial Fibrillation Among Russian Men and Women Aged 55 Years and Older: Prevalence, Mortality, and Associations with Biomarkers in a Population-Based Study. *Journal of Geriatric Cardiology: JGC*. 2020;17(2):74–84.
4. Валиев Н. В., Азизова М. А., Отаева Ш. А., Садиков А. З., Сагдуллаев Ш. Ш. Стандартизация субстанции препарата аксаритмин. *Фармацевтический вестник Узбекистана*. 2017;1:56–60.
5. Канорский С. Г. Современная медикаментозная терапия фибрилляции предсердий: выбор стратегии, антиаритмических препаратов и схем лечения. *Лечащий Врач*. 2012;7:66–70.
6. Ватутин Н. Т., Тарадин Г. Г., Гасендич Е. С., Эль-Хатиб М. А., Реутова Н. О. О вопросах безопасности применения антиаритмических препаратов. *Университетская клиника*. 2018;28(3):68–77.
7. Миронов Н. Ю., Юричева Ю. А., Влодзяновский В. В., Соколов С. Ф., Дзаурова Х. М., Голицын С. П., Шубик Ю. В., Берман М. В., Медведев М. М., Ривин А. Е., Пархомчук Д. С., Барыбин А. Е., Баландин Д. А., Баталов Р. Е., Терехов Д. С., Евстифеев И. В., Кильдеев И. Р., Пятаева О. В., Зенин С. А. Опыт клинического применения отечественного антиаритмического препарата III класса для медикаментозной кардиоверсии фибрилляции и трепетания предсердий: результаты многоцентрового исследования. Часть 1: методология исследования и оценка эффективности. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2021;17(2):193–199. DOI: 10.20996/1819-6446-2021-03-05.
8. Мрочек А. Г., Губарь Е. Н. Эффективность аллапинина у больных ИБС с различными нарушениями ритма сердца. *Российский кардиологический журнал*. 2010;5(85):116–121.
9. Потапова К. В., Носов В. П., Королёва Л. Ю., Аминева Н. В. Современные аспекты лечения трепетания предсердий. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2020;13(2):127–133. DOI: 10.17116/kardio20201302127.
10. Шубик Ю. В., Медведев М. М., Михайлов Е. Н., Гасимова Н. З., Гиляров М. Ю. Лечение фибрилляции предсердий в России: реальная клиническая практика и рекомендации. *Вестник аритмологии*. 2021;28(2):55–63. DOI: 10.35336/VA-2021-2-55-63.
11. Cheremnykh K. P., Savel'ev V. A., Shkurko O. P., Shults E. E. Synthesis of Hybrid Molecules Containing Pyrimidine and Diterpene Alkaloid Lappaconitine Fragments. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2018;54(12):1131–1138. DOI: 10.1007/s10593-019-02404-w.
12. Соколов С. Ф., Беляева М. М., Бакалов С. А., Голицын С. П. Лаппаконитина гидробромид и его пролонгированная форма при желудочковой экстрасистолии у больных без органической патологии сердца: эффективность и безопасность. *Кардиология: Новости. Мнения. Обучение*. 2018;6(2):29–37.
13. Sanoev Z. I., Khamroev T. T., Djaxangirov F. N., Sadikov A. Z., Sagdullaev S. S. Antiarrhythmic Activity of N-Deacetylappaconitine when Administered Orally. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2021;25(2):2339–2346.
14. Дощицин В. Л., Сыров А. В., Павлова Т. В. Применение антиаритмических препаратов: рекомендации и реальная клиническая практика. *Consilium Medicum*. 2019;21(10):86–94.
15. Стуров Н. В., Сыров А. В., Кобыляну Г. Н., Прокофьева Е. Б., Бернша А., Фрейре Да Сильва Т., Котидис И., Беликов И. И. Рациональная фармакотерапия некоторых нарушений ритма сердца на амбулаторном уровне. *Трудный пациент*. 2018;16(12):6–10.
16. Канорский С. Г., Коваленко Ю. С. Современная фармакотерапия фибрилляции предсердий. *Российский кардиологический журнал*. 2017;7(147):171–177. DOI: 10.15829/1560-4071-2017-7-171-177.
17. Nie J., Wang F., Ji T., Zhao J., Zhao F. Assessment of *in vitro* Cardiotoxicity of Extract Fractions and Diterpene Alkaloids from *Aconitum Leucostomum* Worosch: A Short Communication. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2017;137:84–89. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.01.003.
18. Жигунова С. Н., Ибатуллина З. А., Михайленко О. И., Федоров Н. И. Запасы подземной части *Aconitum septentrionale* (Ranunculaceae) в сосново-березовых лесах и на вырубках Южного Урала. *Растительные ресурсы*. 2017;53(3):357–371.
19. Самородов В. В. Средство для лечения аритмии сердца. Патент РФ на изобретение № RU 2513580 C1. 20.04.2014. Доступно по: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_37445337_55047738.pdf Ссылка активна на 20.01.2022.
20. Арчакова О. А., Комаров Т. Н., Порог А. В., Щелгачева Д. С., Аleshina A. B., Багаева Н. С., Шохин И. Е. Определение лаппаконитина, diterпенового алкалоида, получаемого из растений *Aconitum leucostomum*, и его активного метаболита N-дезацетиллаппаконитина в плазме крови и в цельной крови человека. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(3):105–113. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-105-113.
21. Соколов С. Ф. Результаты клинического изучения препарата аллапинин и современные подходы к лечению больных с нарушениями ритма сердца. *Вестник аритмологии*. 2011;64:60–70.
22. Grover A., Benet L. Z. Intermittent Drug Dosing Intervals Guided by the Operational Multiple Dosing Half Lives for Predictable Plasma Accumulation and Fluctuation. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2011;38(3):369–383. DOI: 10.1007/s10928-011-9198-0.
23. Соколов А. В., Тищенко И. Ф., Белоусов Ю. Б. Оптимизация фармакотерапии на основе терапевтического лекарственного мониторинга. *Лечебное дело*. 2004;3:34–39.
24. Doki K., Shirayama Y., Sekiguchi Y., Aonuma K., Kohda Y., Homma M. Optimal Sampling Time and Clinical Implication of the SCN5A Promoter Haplotype in Propafenone Therapeutic Drug Monitoring. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2018;74(10):1273–1279. DOI: 10.1007/s00228-018-2541-2.
25. Gui Y., Lu Y., Li S., Zhang M., Duan X., Liu C. C., Jia J., Liu G. Direct Analysis in Real Time-mass Spectrometry for Rapid Quantification of Five Anti-arrhythmic Drugs in Human Serum: Application to Therapeutic Drug Monitoring. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1–10. DOI: 10.1038/s41598-020-72490-w.
26. Rahman M., Couchman L., Povstyan V., Bainbridge V., Kipper K., El-Nahhas T., Johnston A., Holt D. Rapid Quantitation of Flecainide in Human Plasma for Therapeutic Drug Monitoring Using Liquid Chromatography and Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2019;41(3):391–395. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000586.

REFERENCES

1. Rybakova T. A., Stolyarova V. V., Nazarkina M. G., Leschankina N. Yu. Analysis of the Results of a Five-Year Patients Follow-up in Paroxysmal Atrial Fibrillation Treated with Antiarrhythmics. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2018;7:67–72. (In Russ.) DOI: 10.15829/1560-4071-2018-7-67-72.
2. Gagloeva D. A., Mironov N. Yu., Lajovich L. Yu., Mironova N. A., Golitsyn S. P. Atrial Fibrillation and Chronic Heart Failure: Interrelationship and Approaches to Treatment. *Kardiologicheskii vestnik = Russian Cardiology Bulletin*. 2021;16(2):5–14. (In Russ.) DOI: 10.17116/Cardiobulletin2021160215.

3. Shkolnikova M. A., Jdanov D. A., Ildarova R. A., Shcherbakova N. V., Polyakova E. B., Mikhaylov E. N., Shalnova S. A., Shkolnikov V. M. Atrial Fibrillation Among Russian Men and Women Aged 55 Years and Older: Prevalence, Mortality, and Associations with Biomarkers in a Population-Based Study. *Journal of Geriatric Cardiology: JGC*. 2020;17(2):74–84.
4. Valiev N. V., Azizova M. A., Otaeva Sh. A., Sadikov A. Z., Sagdullaev Sh. Sh. Standardization of the Drug Substance Axaritin. *Farmatsevticheskiy vestnik Uzbekistana*. 2017;1:56–60. (In Russ.)
5. Kanorskiy S. G. Modern Drug Therapy for Atrial Fibrillation: The Choice of Strategy, Antiarrhythmic Drugs and Treatment Regimens. *Lechashchiy Vrach*. 2012;7:66–70. (In Russ.)
6. Vatutin N. T., Taradin G. G., Gasendich E. S., El'-Khatib M. A., Reutova N. O. On The Safety Issues of The Use of Antiarrhythmic Drugs. *Universitetskaya klinika*. 2018;3(28):68–77. (In Russ.)
7. Mironov N. Y., Yuricheva Y. A., Vlodzyanovskiy V. V., Sokolov S. F., Dzaurova K. M., Golitsyn S. P., Shubik Y. V., Berman M. V., Medvedev M. M., Rivin A. E., Parkhomchuk D. S., Barybin A. E., Balandin D. A., Batalov R. E., Terekhov D. S., Evstifeev I. V., Kildeev I. R., Pyataeva O. V., Zenin S. A. Safety and Effectiveness of Pharmacologic Conversion of Atrial Fibrillation and Flutter: Results of Multicenter Trial. Part I: Study Rationale, Design and Assessment of Effectiveness. *Ratsional'naya Farmakoterapiya v Kardiologii*. 2021;17(2):193–199. (In Russ.) DOI: 10.20996/1819-6446-2021-03-05.
8. Mrochek A. G., Gubar' E. N. Allapinine Effectiveness in Patients with Coronary Heart Disease and Cardiac Arrhythmias. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal*. 2010;5(85):116–121. (In Russ.)
9. Potapova K. V., Nosov V. P., Koroleva L. Yu., Amineva N. V. Modern Aspects to the Management of Atrial Flutter. *Kardiologiya i Serdechno-Sosudistaya Khirurgiya*. 2020;13(2):127–133. DOI: 10.17116/kardio202013021127.
10. Shubik Yu. V., Medvedev M. M., Mikhaylov E. N., Gasyanova N. Z., Gilyarov M. Yu. Management of Atrial Fibrillation in Russia: Real Clinical Practice and Current Clinical Guidelines. *Vestnik aritmologii = Journal of Arrhythmology*. 2021;28(2):55–63. (In Russ.) DOI: 10.35336/VA-2021-2-55-63.
11. Cheremnykh K. P., Savel'ev V. A., Shkurko O. P., Shults E. E. Synthesis of Hybrid Molecules Containing Pyrimidine and Diterpene Alkaloid Lappaconitine Fragments. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2018;54(12):1131–1138. DOI: 10.1007/s10593-019-02404-w.
12. Sokolov S. F., Belyaeva M. M., Bakalov S. A., Golitsyn S. P. Lappaconitine Hydrobromide and Its Sustained-Release Form in Case of Ventricular Premature Beats in Patients without Organic Heart Disease: Efficiency and Safety. *Kardiologiya: Novosti. Mneniya. Obuchenie = Cardiology: News, Opinions, Training*. 2018;2(17):29–37. (In Russ.)
13. Sanoev Z. I., Khamroev T. T., Djaxangirov F. N., Sadikov A. Z., Sagdullaev S. S. Antiarrhythmic Activity of N-Deacetylappaconitine when Administered Orally. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2021;25(2):2339–2346.
14. Doshchitsin V. L., Syrov A. V., Pavlova T. V. The Use of Antiarrhythmic Drugs: Guidelines and Actual Clinical Practice. *Consilium Medicum*. 2019;21(10):86–94. (In Russ.)
15. Sturov N. V., Syrov A. V., Kobylanu G. N., Prokofieva E. B., Berisha A., Freire Da Silva T., Kotidis I., Belikov I. I. Rational Pharmacotherapy of Some Cardiac Arrhythmias in Outpatients. *Trudnyj Pacient*. 2018;16(12):6–10. (In Russ.)
16. Kanorskiy S. G., Kovalenko Yu. S. State of the Art Pharmacological Therapy for Atrial Fibrillation. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2017;7(147):171–177. (In Russ.) DOI: 10.15829/1560-4071-2017-7-171-177.
17. Nie J., Wang F., Ji T., Zhao J., Zhao F. Assessment of *in vitro* Cardiotoxicity of Extract Fractions and Diterpene Alkaloids from *Aconitum Leucostomum* Worosch: A Short Communication. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2017;137:84–89. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.01.003.
18. Zhigunova S. N., Ibatullina Z. A., Mikhaylenko O. I., Fedorov N. I. Stock of *Aconitum Septentrionale* (Ranunculaceae) Underground Parts in the Pine-Birch Forests and Follings of the Southern Urals. *Rastitel'nye resursy*. 2017;53(3):357–371. (In Russ.)
19. Samorodov V. V. *Sredstvo dlya lecheniya aritmii serdtsa* [Drug Preparation for the Treating Cardiac Arrhythmia]. Patent RUS № 2513580 C1. 20.04.2014. Available at: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_37445337_55047738.pdf Accessed: 20.01.2022. (In Russ.)
20. Archakova O. A., Komarov T. N., Rogov A. V., Shchegacheva D. S., Aleshina A. V., Bagaeva N. S., Shohin I. E. Determination of Lappaconitin, Diterpene Alkaloids Obtained from Plants *Aconitum leucostomum*, and its Active Metabolite N-desacetylappaconitin in Human Plasma and Blood. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(3):105–113. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-105-113.
21. Sokolov S. F. Results of Clinical Studies of Allapinin and Up-To-Date Approaches to Treatment of Patients with Cardiac Arrhythmias. *Vestnik aritmologii*. 2011;64:60–70. (In Russ.)
22. Grover A., Benet L. Z. Intermittent Drug Dosing Intervals Guided by the Operational Multiple Dosing Half Lives for Predictable Plasma Accumulation and Fluctuation. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2011;38(3):369–383. DOI: 10.1007/s10928-011-9198-0.
23. Sokolov A. V., Tishchenkova I. F., Belousov Yu. B. Optimization of Pharmacotherapy Based on Therapeutic Drug Monitoring. *Lechenoe Delo*. 2004;3:34–39. (In Russ.)
24. Doki K., Shirayama Y., Sekiguchi Y., Aonuma K., Kohda Y., Homma M. Optimal Sampling Time and Clinical Implication of the SCN5A Promoter Haplotype in Propafenone Therapeutic Drug Monitoring. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2018;74(10):1273–1279. DOI: 10.1007/s00228-018-2541-2.
25. Gui Y., Lu Y., Li S., Zhang M., Duan X., Liu C. C., Jia J., Liu G. Direct Analysis in Real Time-mass Spectrometry for Rapid Quantification of Five Anti-arrhythmic Drugs in Human Serum: Application to Therapeutic Drug Monitoring. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1–10. DOI: 10.1038/s41598-020-72490-w.
26. Rahman M., Couchman L., Povstyan V., Bainbridge V., Kipper K., El-Nahhas T., Johnston A., Holt D. Rapid Quantitation of Flecainide in Human Plasma for Therapeutic Drug Monitoring Using Liquid Chromatography and Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2019;41(3):391–395. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000586.

20^{ЛЕТ} АНАЛИТИКА
ЭКСПО

a Hyve event

20-я Международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

19–22.04.2022

Москва, Крокус Экспо



analitikaexpo.com



Для бесплатного прохода
на выставку зарегистрируйтесь
на сайте, указав промокод

pharmjournal

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-149-158>
УДК 615.1



Оригинальная статья / Research article

Системный подход к управлению рисками перекрестной контаминации при производстве лекарственных средств

А. А. Держинская^{1*}, А. А. Спиридонова², Е. Г. Хомутова²

¹ ФГУП «Московский эндокринный завод», 109052, Россия, г. Москва, ул. Новохоловская, д. 25

² ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (РТУ МИРЭА), 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86

*Контактное лицо: Держинская Анна Александровна. E-mail: dzerzhinskaya@gmail.com

ORCID: А. А. Держинская – <https://orcid.org/0000-0002-6252-2619>; А. А. Спиридонова – <https://orcid.org/0000-0001-7601-1281>;

Е. Г. Хомутова – <https://orcid.org/0000-0001-7467-8939>.

Статья поступила: 30.08.2021

Статья принята в печать: 28.01.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Правила надлежащей производственной практики (GMP – Good Manufacturing Practice) требуют от производителей лекарственных средств применения принципов управления рисками в своей деятельности. Одним из основных рисков для качества и безопасности фармацевтической продукции является перекрестная контаминация. Внедрение системного подхода к управлению рисками контаминации требует от производителей всесторонней оценки как процессов производства, так и организации производственных участков (помещения, оборудование, системы и др.). Поэтому переход к актуальным требованиям GMP для функционирующих производственных участков может потребовать значительно большие финансовые и трудозатраты, чем для проектируемых производств.

Цель. Разработка научно обоснованных методических положений процесса управления рисками перекрестной контаминации для действующих фармацевтических производств с учетом обеспечения соответствия гармонизированным требованиям GMP РФ, ЕАЭС и мировой практики.

Материалы и методы. В ходе исследования были использованы инструменты и методы управления рисками, анализа и систематизации данных, процессный подход.

Результаты и обсуждение. Обозначены ключевые аспекты организации совмещенного производства лекарственных средств. Описан поэтапный подход к управлению рисками, предполагающий предварительную оценку соответствия организации производства требованиям GMP. Предложенная схема направлена на обеспечение непрерывного функционирования процесса управления рисками перекрестной контаминации.

Заключение. Представленная методика управления рисками направлена на проведение надлежащей оценки рисков перекрестной контаминации для многономенклатурных фармацевтических предприятий. Данная методика позволяет выявить области, которые требуют улучшения для обеспечения соответствия производственных участков требованиям GMP, что в конечном итоге способствует повышению качества лекарственных средств.

Ключевые слова: качество, обеспечение качества, перекрестная контаминация, риск, управление рисками, фармацевтическое производство

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. А. Держинская планировала исследование, провела анализ информационных материалов и обработку результатов. А. А. Спиридонова и Е. Г. Хомутова редактировали и анализировали материалы. Все авторы принимали активное участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Держинская А. А., Спиридонова А. А., Хомутова Е. Г. Системный подход к управлению рисками перекрестной контаминации при производстве лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):149–158. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-149-158>

Systematic approach to cross-contamination risk management in the production of medicinal products

Anna A. Dzerzhinskaya^{1*}, Alexandra A. Spiridonova², Elena G. Khomutova²

¹ Federal State Unitary Enterprise "Moscow Endocrine Plant", 25, Novokhokhlovskaya str., 109052, Russia

² Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "MIREA – Russian Technological University", 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

*Corresponding author: Anna A. Dzerzhinskaya. E-mail: dzerzhinskaya@gmail.com

ORCID: Anna A. Dzerzhinskaya – <https://orcid.org/0000-0002-6252-2619>; Alexandra A. Spiridonova – <https://orcid.org/0000-0001-7601-1281>;

Elena G. Khomutova – <https://orcid.org/0000-0001-7467-8939>.

Received: 30.08.2021

Revised: 28.01.2022

Published: 25.02.2022

Abstract

Introduction. Good Manufacturing Practice (GMP) requires drug manufacturers to apply risk management principles in their operations. One of the main risks to the quality and safety of pharmaceuticals is cross-contamination. The introduction of a systematic approach to contamination risk management requires manufacturers to make a comprehensive assessment of both production processes and the organization of production sites (premises, equipment, systems, etc.). Therefore, the transition to the current GMP requirements for operating production sites may require significantly higher financial and labor costs than for projected production facilities.

© Держинская А. А., Спиридонова А. А., Хомутова Е. Г., 2022

© Dzerzhinskaya A. A., Spiridonova A. A., Khomutova E. G., 2022

Aim. Development of a scientifically based program and methodology for cross-contamination risk management for existing pharmaceutical industries, taking into account compliance with the harmonized GMP requirements of the Russian Federation and the EAEU and world practice.

Materials and methods. In the course of the study, methods of risk management, analysis and systematization of data and a process approach were used.

Results and discussion. The key aspects of the organization of the co-manufacturing of medicines are outlined. A step-by-step approach to risk management, involving a preliminary assessment of the conformity of a production organization with GMP requirements is described. The proposed scheme is aimed at ensuring the continuous functioning of the cross-contamination risk management process.

Conclusion. The presented risk management methodology aims to conduct a proper assessment of the risks of cross-contamination for multi-product pharmaceutical enterprises. This technique allows to identify areas that need improvement to ensure compliance of manufacturing sites with GMP requirements, which ultimately contributes to improving the quality of medicines.

Keywords: quality, quality assurance, cross-contamination, risk, risk management, pharmaceutical manufacturing

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Anna A. Dzerzhinskaya planned the research, analyzed information materials and processed the results. Alexandra A. Spiridonova and Elena G. Khomutova edited and analyzed the materials. All authors took an active part in discussing the results and writing the text of the article.

For citation: Dzerzhinskaya A. A., Spiridonova A. A., Khomutova E. G. Systematic approach to cross-contamination risk management in the production of medicinal products. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):149–158. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-149-158>

ВВЕДЕНИЕ

Получение безопасного и эффективного лекарственного средства является приоритетной задачей для фармацевтических производителей. На каждом этапе жизненного цикла лекарственного средства должны приниматься специфические меры для обеспечения качества производимой продукции.

На многономенклатурных предприятиях могут возникнуть специфические трудности в ходе формирования и внедрения мер, направленных на предотвращение контаминации. Наибольшая трудность заключается в том, что на производственных площадках одновременно могут работать несколько линий для выпуска различных наименований, видов и форм лекарственных средств.

Основные требования по управлению риском перекрестного загрязнения изложены в главе 3 «Помещения и оборудование» и главе 5 «Производство» правил GMP. Однако имеются различия в определении степени и необходимости выделения производства между GMP РФ, ЕАЭС и мировой практики.

Ранее большинство регуляторных требований для фармацевтической отрасли определяли несколько групп препаратов, производство которых должно быть выделено. Например, правила GMP РФ относят к таким группам «антибиотики, определенные гормонов, цитотоксины, высоко активные лекарственные средства» [1]. Однако указанная терминология может

вносить неопределенность в трактовке правил фармацевтическими производителями.

С целью усовершенствования инструментов предотвращения перекрестной контаминации, в 2015 году в главах 3 и 5 GMP ЕС, а в последующем в GMP ЕАЭС, исключено указание на конкретные группы лекарственных средств и расширен перечень предлагаемых к внедрению технических и организационных мер [2].

В действующих правилах GMP ЕАЭС и ЕС указана необходимость выделять производственные участки, в случаях невозможности удержания риска перекрестной контаминации под контролем, когда:

- соответствующие технические и организационные меры не снижают уровень риска;
- данные научно-обоснованной токсикологической оценки подтверждают высокий риск для безопасности и здоровья пациентов;
- остаточные количества лекарственного средства после проведения очистки не могут быть обнаружены валидированной аналитической методикой [3, 4].

Также, например, FDA США (Food and Drug Administration – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) ожидает от производителей наличие документированной оценки риска, определяющей можно ли производить продукцию на совмещенных производствах, и необходимые средства контроля для управления риском перекрестного загрязнения на этих объектах [5].

Цель. Разработка научно обоснованных методических положений процесса управления рисками перекрестной контаминации для действующих фармацевтических производств с учетом обеспечения соответствия гармонизированным требованиям GMP РФ, ЕАЭС и мировой практики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования были использованы основные положения методов оценки рисков и процессного подхода. Проведен анализ и систематизация данных.

Основным документом, определяющим принципы управления рисками для качества лекарственных средств, является ICH Q9 «Управление рисками по качеству», разработанный в рамках Международной конференции по гармонизации требований к регистрации лекарственных средств для человека (ICH – International Conference Harmonization) [6]. Положения ICH Q9 включены в состав части III GMP ЕС и GMP ЕАЭС. В Российской Федерации текст руководства отражен в рекомендациях по управлению рисками для качества, утвержденных приказом Минпромторга РФ от 12.12.2013 г. № 1997 [7].

Для формирования системы управления риском перекрестной контаминации с целью непрерывного поддержания качества продукции и безопасности персонала, задействованного в фармацевтическом производстве, был применен подход, изложенный в руководстве Risk-MAPP [8], которое действует под эгидой ISPE (The International Society for Pharmaceutical Engineering – Международное общество для фармацевтического инжиниринга).

С целью идентификации рисков авторами выделены шесть групп основных источников контаминации [9]:

- 1) персонал (сотрудники, задействованные в контроле и осуществлении процесса производства);
- 2) здания и помещения (конструкция и планировка производственных участков);
- 3) оборудование (производственное, лабораторное оборудование и инвентарь, находящиеся в прямом контакте с продукцией);
- 4) сырье и материалы (исходное сырье, материалы первичной упаковки и др.);
- 5) производственный процесс (контаминации сырья, материалов, полупродуктов и готового продукта на любой стадии за счет организации производства);
- 6) инженерные системы (системы водоподготовки, подачи процессных газов, HVAC (Heating, ventilation, and air conditioning – отопление, вентиляция и кондиционирование), которые являются средой для образования механических частиц, микроорганизмов, а также представляют собой средство распространения контаминантов по всему производству).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Управление рисками является составной частью GMP и одним из основных элементов фармацевтической системы качества, способствующим разработке и функционированию эффективной системы качества [10]. Производителю лекарственных средств необходимо иметь утвержденную систему управления рисками для качества, в которой описываются основные подходы и методы по оценке рисков, применяемые на предприятии.

Подготовка к запуску процесса управления рисками

Процедура по управлению рисками перекрестной контаминации должна быть документально оформлена и содержать (как минимум):

- описание этапов процесса;
- распределение ответственности;
- состав рабочей группы по управлению рисками;
- применяемые методы общей оценки рисков;
- критерии анализа и оценки рисков;
- политику принятия решения о приемлемости риска;
- порядок документирования процесса управления рисками;
- требования к оформлению и составлению протокола управления рисками;
- требования к оформлению и составлению отчета управления рисками;
- порядок мониторинга рисков;
- порядок составления обзора рисков;
- требования к переоценке рисков перекрестной контаминации.

Формирование рабочей группы по управлению рисками перекрестной контаминации

Рабочая группа по управлению рисками перекрестной контаминации должна быть сформирована из квалифицированных специалистов в области фармации, производства, обеспечения и контроля качества лекарственных средств (таблица 1). При достаточной компетентности, один сотрудник может совмещать несколько областей ответственности.

Сбор информации

Для проведения идентификации, анализа и оценки рисков перекрестной контаминации, а также для формирования корректирующих и предупреждающих мер, необходимо собрать достаточный объем данных.

В качестве источников информации могут служить:

- проект организации производственного участка;
- схемы потоков сырья, продукции и персонала;

Таблица 1. Рекомендуемый состав рабочей группы

Table 1. Recommended workgroup

Роль Role	Должность Position	Область ответственности Area of responsibility
Руководитель рабочей группы Working group leader	Сотрудник отдела/службы обеспечения качества по управлению рисками Risk Management Quality Assurance Officer	Координирование работы группы. Документирование процесса. Сбор и анализ информации. Информирование о рисках. Составление обзора по рискам. Обеспечение соответствия процесса правилам GMP Coordinating the work of the group. Documenting the process. Collection and analysis of information. Risk communication. Compilation of a risk overview. Ensuring process compliance with GMP rules
Член рабочей группы Working group member	Сотрудник отдела / службы обеспечения качества Quality Assurance Officer	Оценка соответствия производства правилам GMP Assessment of production for compliance with GMP rules
Член рабочей группы Working group member	Сотрудник отдела / службы контроля качества Quality Control Officer	Оценка системы внутрипроизводственного контроля Assessment of the internal production control system
Член рабочей группы Working group member	Сотрудник службы валидации / квалификации Validation / Qualification Officer	Оценка системы квалификации / валидации Assessment of the qualification / validation system
Член рабочей группы Working group member	Сотрудник R&D R&D Officer	Оценка свойств лекарственного препарата Evaluation of a medicinal product
Член рабочей группы Working group member	Фармацевт / токсиколог Pharmacist / Toxicologist	Оценка фармакологических и токсикологических данных Evaluation of pharmacological and toxicological data
Член рабочей группы Working group member	Сотрудник инженерной службы Engineer Service Officer	Оценка эксплуатации и технического обслуживания помещений, оборудования и систем Assessment of operation and maintenance of premises, equipment and systems
Член рабочей группы Working group member	Сотрудник производственного участка / Технолог Production site employee / Technologist	Оценка производственного процесса Manufacturing process assessment
Независимый эксперт Independent expert	Уполномоченный по качеству, сотрудники иных служб Qualified Person, employees of other services	Предоставление дополнительного экспертного мнения в области рисков в рамках своей компетенции Providing additional expert opinion on risks within its competence

- технологические инструкции и процедуры, в том числе по эксплуатации, обслуживанию оборудования и систем;
- результаты квалификации и валидации оборудования, помещений, систем и процессов;
- процедуры очистки, внутрипроизводственного контроля и уничтожения отходов производства;
- результаты мониторинга рисков (включая информацию по претензиям и рекламациям; результаты самоинспекций и внешних аудитов; отклонения и изменения);
- данные обзоров качества продукции и т. д.

Составление протокола управления рисками

Перед запуском процесса управления рисками, руководитель рабочей группы должен разработать протокол управления рисками перекрёстной контаминации, организовать его согласование и утверждение. Протокол должен соответствовать объекту и методологии управления рисками.

Идентификация опасностей

Процесс управления рисками начинается с процесса идентификации опасностей.

В первую очередь, необходимо идентифицировать принадлежность лекарственных средств к препаратам, требующим организации выделенного производства (пенициллины, и другие бета-лактамы антибиотики). В случае их идентификации, сразу формируется отчет, и данная информация предоставляется для оценки высшему руководству.

Далее должны быть идентифицированы высокоопасные вещества (определенные гормоны, цитотоксины, высокоактивные вещества и т. д.). В случае их идентификации, оценивается возможность предотвращения и контроля контаминации для обеспечения безопасности здоровья персонала и пациентов. При ее отсутствии, формируется отчет с заключением о необходимости организации выделенного производства, и данная информация предоставляется для оценки высшему руководству.

Если указанные выше препараты не производятся на оцениваемом участке, проводится идентификация препарата «наихудшего случая», представляющего наибольший риск здоровью пациентов и персонала. На основании данных токсикологических исследований, определения допустимой ежедневной экспозиции, физико-химических и фармакологических свойств действующего вещества устанавливается значение тяжести последствий наступления опасности.

На данном этапе могут использоваться различные методы управления рисками, позволяющие выявить опасность. Для первичной идентификации рисков посредством предварительно проведенного мозгового штурма целесообразно использовать диаграмму Исикавы. Также здесь можно применить более сложные методы: вместо мозгового штурма – метод Дельфи, а вместо диаграммы Исикавы – анализ дерева ошибок (FTA – Fault tree analysis), анализ дерева событий (ETA – Event tree analysis), индуктивные методы, к примеру, исследование опасности и работоспособности (HAZOP – Hazard and operability study), анализ рисков и критические контрольные точки (НАССР – Hazard analysis and critical control points) [11, 12].

Анализ и оценка рисков

Для действующих производственных участков необходимо провести предварительный анализ соответствия существующих технических и организационных мер требованиям GMP. Оценка может быть выполнена в виде опросного листа, в рамках которого рабочая группа должна идентифицировать области, требующие проведения углубленного анализа рисков.

Если существующие технические и организационные меры удовлетворяют требованиям правил GMP, то переходить к последующим этапам анализа рисков не требуется. При необходимости подробного анализа рисков, необходимо перейти на стадию количественного анализа и оценки.

Анализ путей

перекрестной контаминации

Риск формируется из опасности и воздействия. Любой лекарственный препарат представляет собой опасность, но уровень опасности зависит от последствий воздействия на здоровье пациента. Для минимизации риска необходимо снизить степень воздействия при условии наличия информации о дозах препарата, при которых возникает опасность.

Для анализа и оценки рисков перекрестной контаминации рекомендуется применять метод FMEA (Failure Mode and Effects Analysis – анализ видов и последствий отказов) [13]. Данный метод позволяет

провести анализ тяжести последствий, вероятность возникновения и возможность предотвращения опасности. Результатом оценки рисков является выраженная количественно величина, которая сопоставляется с критериями приемлемости рисков для принятия решений о будущих действиях в отношении выявленных рисков.

В соответствии с методологией FMEA, значение уровня критичности риска формируется на основании количественных значений соответствующих факторов. Для каждого фактора рабочая группа по управлению рисками устанавливает шкалу значений на основании литературных данных, опыта производства, данных по физико-химическим свойствам веществ и токсикологии. Допустимо использовать принятые в рамках управления рисками на предприятии шкалы оценки, если они применимы к специфике анализа и оценки рисков.

Существует четыре общепринятых пути контаминации [8, 14]:

- перепутывание;
- удержание остатков на поверхностях;
- механический перенос;
- воздушный перенос.

В процессе управления рисками перекрестной контаминации проводится последовательный анализ всех путей контаминации, начиная с перепутывания, так как данный путь является наиболее критичным.

Оценку риска следует проводить так, чтобы для каждого идентифицированного риска было определено, насколько устранение или снижение данного риска важно для производства безопасного и качественного продукта, а также возможность управления данным риском для соответствия обеспечения установленным уровням.

Для каждой выявленной опасной ситуации необходимо, применяя критерии, определить приемлемость риска. Например, если риск находится на уровне «умеренный риск» и выше, то необходимо сформировать действия для понижения уровня риска до приемлемых значений.

Формирование корректирующих и предупреждающих действий

Мероприятия по снижению риска должны быть соразмерны с выявленным уровнем риска. Необходимо принять решение о приемлемости или неприемлемости уровней риска. Для этой цели можно принять подходы ISPE [8]:

- принятие риска: отсутствие возможности внедрения эффективных корректирующих / предупреждающих мер или их наличие (отсутствие необходимости дополнительных мер);

- уход от риска: выявленный риск может быть исключен за счет внесения корректировок, исключающих существование риска;
- снижение риска: следует применять меры по снижению риска, чтобы гарантировать, что риск не увеличится до неприемлемого.

Стратегия контроля рисков не должна противоречить требованиям надлежащих практик, нормативно-правовых актов и требованиям охраны труда. При разработке плана CAPA (corrective and preventive actions – корректирующие и предупреждающие действия) следует отталкиваться от технических и организационных мер, предложенных правилами GMP.

Для высокоопасных веществ мероприятия рекомендуется разрабатывать с учетом внедрения систем контейнента, например, применением изоляторных технологий. Если невозможно сформировать меры, достаточные для снижения риска, то формируется отчет с заключением о необходимости организации выделенного производства, и данная информация предоставляется для оценки высшему руководству.

За внедрение мер по снижению уровня рисков назначается ответственное лицо, которое в рамках процесса управления рисками отвечает за мониторинг выявленного риска (как правило, сотрудник службы обеспечения качества).

Составление отчета по управлению рисками

Результатом процесса является утвержденный отчет по управлению рисками перекрестной контаминации, содержащий основные результаты и выводы проведенной работы. Пример оформления результатов анализа и оценки рисков приведен в таблице 2.

В процессе мониторинга рисков представленная таблица может быть дополнена следующей информацией:

- мероприятия, т.е. корректирующие и/или предупреждающие действия, сформированные для снижения уровня риска, если принято не иное решение;
- ответственный за внедрение и эффективность мер по снижению риска (или ответственный за поддержание эффективности существующих мер);
- срок внедрения;
- результаты внедрения мероприятий, на основании которых проводится переоценка риска и делается заключение об их эффективности;
- тяжесть (повторная оценка после внедрения мероприятий по управлению рисками);
- вероятность возникновения (после внедрения мероприятий по управлению рисками);
- вероятность обнаружения риска (результат внедрения мероприятий по управлению рисками);

- ПЧР (приоритетное число риска, установленное по результатам переоценки рисков после внедрения корректирующих и/или предупреждающих мер).

Ознакомление заинтересованных лиц с результатами управления рисками перекрестной контаминации

В функционирование процесса должны быть вовлечены все заинтересованные стороны. Реализуемые стратегии контроля риска должны быть соразмерны уровню риска. Окончательное решение относительно соответствующей стратегии контроля должно приниматься высшим руководством и может опираться как на качественные, так и на количественные данные.

Согласованный и утвержденный отчет распределяется всем заинтересованным подразделениям, в том числе ответственным за внедрение мер по снижению рисков. Оригинал отчета хранится в службе обеспечения качества.

Непрерывный мониторинг рисков перекрестной контаминации в рамках функционирования ФСК

Результатом процесса управления рисками должна стать система предотвращения и мониторинга рисков перекрестной контаминации, представляющая собой непрерывный процесс.

Мониторинг рисков проводится на основании данных контроля чистоты оборудования, контроля качества лекарственных препаратов, мониторинга производственной среды, информации об отклонениях, претензиях и изменениях, касающихся объекта управления рисками, полезным источником информации также является обзор по качеству выпускаемой продукции.

По мере появления новых данных показатели, используемые для оценки риска, и ранее принятые решения подлежат периодическому пересмотру и дополнению с учетом накопленного опыта и новых знаний.

За своевременное информирование руководителя рабочей группы о выявлении неспецифических трендов или отклонений в рамках контроля и предупреждения перекрестной контаминации отвечают операторы производства и их руководители.

Реестр рисков и определение эффективности внедрения технических и организационных мер

Результаты оценки рисков, мониторинга и иная информация о рисках формируется в реестр рисков предприятия.

Таблица 2. Пример оформления результатов анализа и оценки рисков
Table 2. An example of formalizing the results of analysis and risk assessment

Участок Site	Этап процесса производства Process step	Потенциальная причина contamination Potential failure	Путь контаминации Route of contamination	Тяжесть Severity	Потенциальная причина возникновения риска Potential Cause of Risk	Меры предотвращения Prevention measures	Вероятность возникновения Occurrence	Меры контроля Current controls	Вероятность определения Detection	ПЧР RPN	Решение Resolution
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Участок ТПО OSD site	Весь процесс (степень декомпозиции процесса определяется необходимостью детализации анализа рисков) The entire production process (the degree of decomposition is determined by the need for detailed risk analysis)	Распыление веществ в воздух рабочей зоны Spraying substances into the air of the working area	Воздушный перенос Airborne transfer	10	Недостаточная эффективность вытяжной системы Insufficient efficiency of the exhaust system	Применение фильтров не ниже F9 на вытяжках в помещениях и H14 в оборудовании. Применение «закрытых» систем и локальных вытяжек. Система HVAC без рециркуляции в критических помещениях The use of filters not lower than F9 on hoods in rooms and H14 in equipment. Application of «closed» systems and local hoods. HVAC system without recirculation in critical areas	5	Организация «запирающих» воздушных шлюзов с контролем перепадов давления. Контроль целостности фильтров Organization of «locking» air locks with pressure drop control. Filter integrity control	3	150	Снижение риска Risk reduction

За составление и ведение реестра рисков отвечает руководитель рабочей группы. Данный документ представляет собой «выход» процесса и является инструментом верификации результатов, необходимым для своевременного выявления потенциальных рисков отсутствия эффективности предпринимаемых технических и организационных мер по предотвращению перекрестной контаминации.

Переоценка рисков

Проведение периодической переоценки рисков должно осуществляться рабочей группой с установленной частотой, с использованием надлежащих методов и утвержденных процедур в рамках мониторинга. Это необходимо для обеспечения уверенности в том, что данные, использованные для анализа рисков, результаты идентификации рисков, принятые решения и соответствующая документация остаются актуальным. Кроме того, необходимо отслеживать, что критерии, используемые для оценки риска и его элементов, по-прежнему остаются действительными и согласующимися с целями, стратегиями и политикой в области качества.

Переоценка рисков может проводиться в случае внесения существенных изменений на технологическом участке, например, внедрении нового препарата или изменении оборудования.

Предложенная система управления рисками перекрестной контаминации может быть представлена в виде непрерывного процесса (рисунок 1). Для обеспечения эффективного внедрения данной системы процесс должен быть задокументирован и функционировать в рамках фармацевтической системы качества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основным результатом данной работы стала адаптация методов управления рисками применительно к проблеме проведения анализа рисков перекрестной контаминации.

Описан поэтапный подход к формированию системы управления рисками перекрестной контаминации, предполагающий предварительную оценку соответствия организации производства требованиям GMP, оценку необходимости выделения производства и анализ путей контаминации.

Внедрение разработанного подхода, основанного на оценке механизмов переноса загрязнителей, позволит производителям оптимизировать действующие меры по предотвращению загрязнения, детально идентифицировать области с неприемлемым уровнем риска, и определить дополнительные мероприятия, минимизировав выделение финансовых и организационных ресурсов.

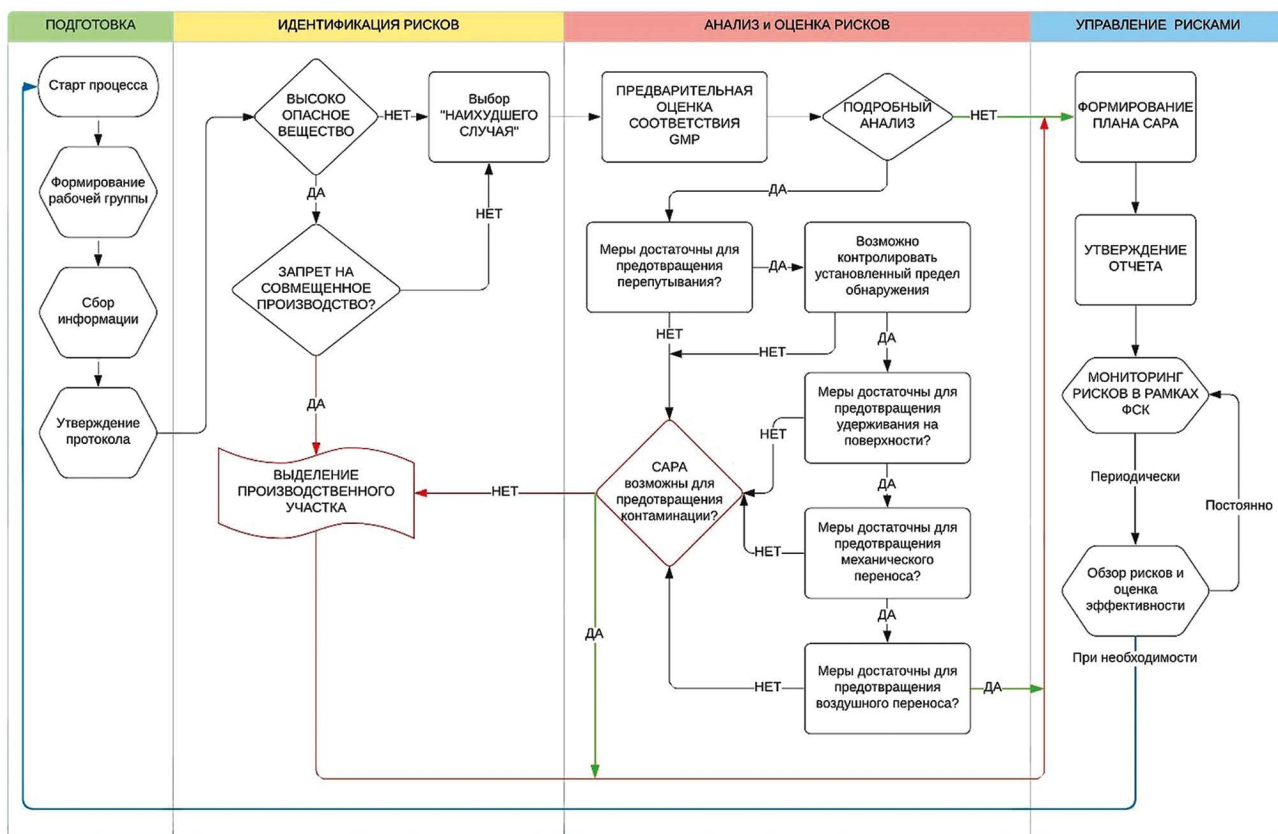


Рисунок 1. Блок-схема процесса управления рисками перекрестной контаминации

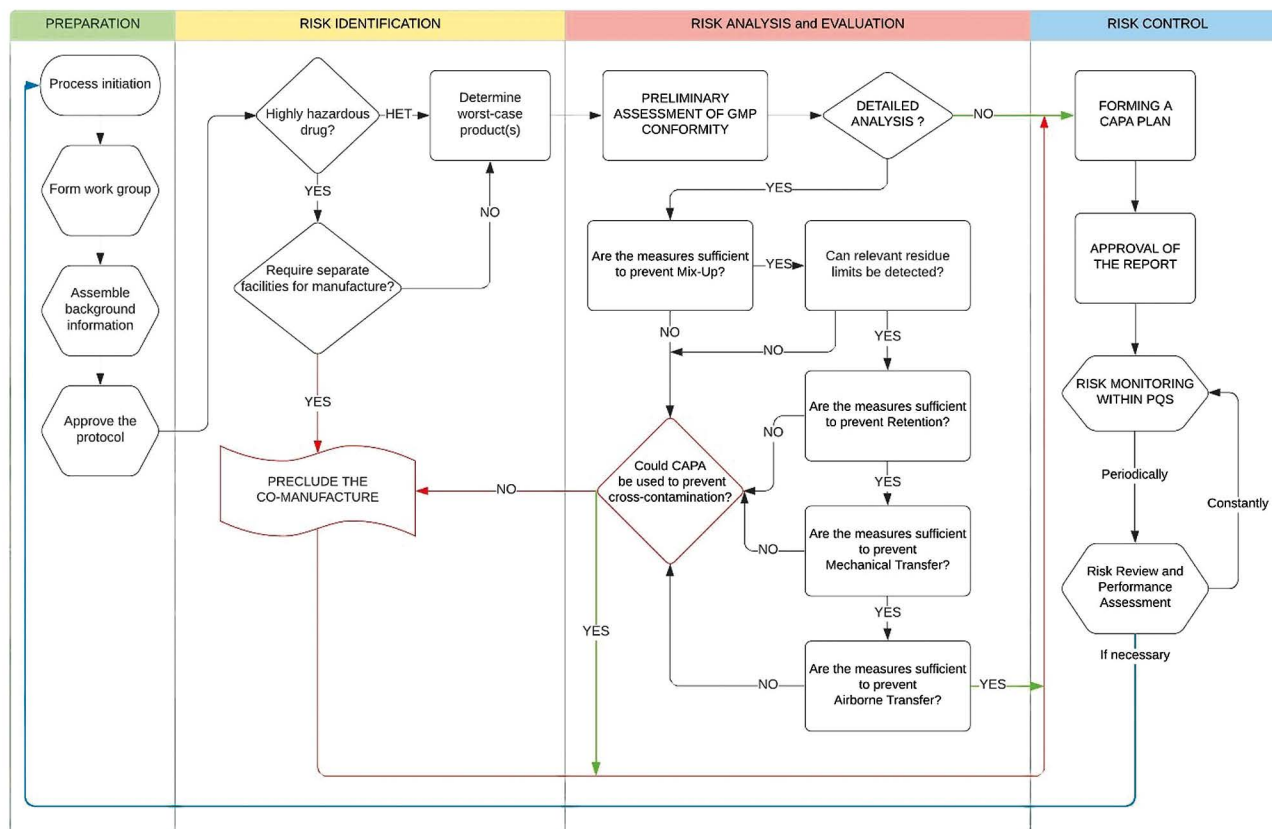


Figure 1. Flow chart of the cross-contamination risk management process

Новизна представленного подхода к анализу рисков заключается во включении в систему управления рисками на фармацевтических предприятиях положений научно-обоснованного подхода к проведению оценки рисков перекрестной контаминации с учетом данных токсикологической оценки лекарственных препаратов, основанного на актуальных требованиях правил GMP РФ и ЕАЭС.

ЛИТЕРАТУРА

- Об утверждении Правил надлежащей производственной практики: Приказ Минпромторга России от 14.06.2013г. № 916 (с изменениями на 18.12.2015 г.): зарегистрировано в Минюсте России 10.09.2013 № 29938. Доступно по: <http://www.consultant.ru>. Ссылка активна на 18.08.2021.
- Подпругников Ю. В., Шестаков В. Н. Обзор, характеристика и анализ последних изменений в требованиях GMP *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(3):202–218.
- Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза: Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77. Доступно по: <http://www.consultant.ru>. Ссылка активна на 18.08.2021.
- EudraLex Volume 4 EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. 2015. Available at: https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_en. Accessed: 18.08.2021.
- Sargent E. V., Flueckiger A., Lovsin Barle E., Luo W., Molnar L. R., Sandhu R., Weideman P. A. The Regulatory Framework for Preventing Cross-Contamination of Pharmaceutical Products: History and Considerations for the Future. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*. 2016;79(1):S3–S10. DOI: 10.1016/j.yrtph.2016.05.029.
- ICH guideline Q9 on quality risk management: EMA/CHMP/ICH/24235/2006 – 2015. Available at: <https://ich.org/page/quality-guidelines>. Accessed: 18.08.2021.
- Приказ Минпромторга России от 12.12.2013 № 1997 «Об утверждении Рекомендаций по организации производства и контроля качества лекарственных средств». Доступно по: <http://www.consultant.ru>. Ссылка активна на 18.08.2021.
- ISPE Baseline® Guide: Volume 7 – Risk-Based Manufacture of Pharmaceutical Products (Risk-MaPP). Makati: International Society for Pharmaceutical Engineering; 2017. 178 p.
- How safe is your process? The usual causes of pharmaceutical contamination. *Pharmaceutical Technology*. 2018. Available at: <https://www.pharmaceutical-technology.com/powder-handling/causes-of-pharmaceutical-contamination>. Accessed: 15.09.2021.
- ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system EMA/CHMP/ICH/214732/2007 – 2008. Available at: <https://ich.org/page/quality-guidelines>. Accessed: 18.08.2021.
- Спиридонова А. А., Хомутова Е. Г. Риск-ориентированный подход в системе менеджмента качества промышленного предприятия: проблема выбора методов управления рисками. *Организатор производства*. 2017;25(2):92–100. DOI: 10.25065/1810-4894-2017-25-2-92-100.
- ГОСТ Р 58771-2019 «Менеджмент риска. Технологии оценки риска». М.: Стандартинформ; 2020. 146 с.
- Спиридонова А. А., Рудакова В. А., Хомутова Е. Г. Управление рисками для качества при производстве иммунобиологического препарата на стадии культивирования продуцента. *Биофармацевтический журнал*. 2019;11(4):54–60. DOI: 10.17513/np.407.
- Inspection of health based exposure limit (HBEL) assessments and use in quality risk management: AIDE-memoire PI 052-1. Secretariat of the Pharmaceutical Inspection Convention. 2020. Available at: <http://www.picscheme.org>. Accessed: 08.08.2021.

REFERENCES

1. Ob utverzhdenii Pravil nadležashchey proizvodstvennoy praktiki: Prikaz Minpromtorga Rossii ot 14.06.2013g. № 916 (s izmeneniyami na 18.12.2015 g.): zaregistrirovano v Minyuste Rossii 10.09.2013 № 29938 [On the approval of the Rules of Good Manufacturing Practice: Order of the Ministry of Industry and Trade of Russia dated 14.06.2013 No 916 (as amended on December 18, 2015): registered with the Ministry of Justice of Russia on September 10, 2013 No. 29938]. Available at: <http://www.consultant.ru>. Accessed: 18.08.2021. (In Russ.)
2. Podpruznikov Yu. V., Shestakov V. N. Review, characteristics and analysis of the last changes in the GMP requirements. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;(3):202–218. (In Russ.)
3. Ob utverzhdenii Pravil nadležashchey proizvodstvennoy praktiki Evraziyskogo ekonomicheskogo soyuza: Reshenie Soveta Evraziyskoy ekonomicheskoy komissii ot 03.11.2016 № 77 [On approval of the Rules of Good Manufacturing Practice of the Eurasian Economic Union: Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission dated 03.11.2016 No 77]. Available at: <http://www.consultant.ru>. Accessed: 18.08.2021. (In Russ.)
4. EudraLex Volume 4 EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. 2015. Available at: https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_en. Accessed: 18.08.2021.
5. Sargent E. V., Flueckiger A., Lovsin Barle E., Luo W., Molnar L. R., Sandhu R., Weideman P. A. The Regulatory Framework for Preventing Cross-Contamination of Pharmaceutical Products: History and Considerations for the Future. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*. 2016;79(1):S3–S10. DOI: 10.1016/j.yrtph.2016.05.029.
6. ICH guideline Q9 on quality risk management: EMA/CHMP/ICH/24235/2006 – 2015. Available at: <https://ich.org/page/quality-guidelines>. Accessed: 18.08.2021.
7. Prikaz Minpromtorga Rossii ot 12.12.2013 № 1997 "Ob utverzhdenii Rekomendatsiy po organizatsii proizvodstva i kontrolya kachestva lekarstvennykh sredstv" [Order of the Ministry of Industry and Trade of Russia dated December 12, 2013 No. 1997 "On approval of the Recommendations for the organization of production and quality control of medicines"]. Available at: <http://www.consultant.ru>. Accessed: 18.08.2021. (In Russ.)
8. ISPE Baseline® Guide: Volume 7 – Risk-Based Manufacture of Pharmaceutical Products (Risk-MaPP). Makati: International Society for Pharmaceutical Engineering; 2017. 178 p.
9. How safe is your process? The usual causes of pharmaceutical contamination. *Pharmaceutical Technology*. 2018. Available at: <https://www.pharmaceutical-technology.com/powder-handling/causes-of-pharmaceutical-contamination>. Accessed: 15.09.2021.
10. ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system EMA/CHMP/ICH/214732/2007 – 2008. Available at: <https://ich.org/page/quality-guidelines>. Accessed: 18.08.2021.
11. Spiridonova A. A., Khomutova E. G. The risk-oriented approach in the quality management system of an industrial enterprise: the problem of selecting the methods of risk management. *Organizator proizvodstva = Organizer of Production*. (In Russ.) 2017;25(2):92–100. DOI: 10.25065/1810-4894-2017-25-2-92-100.
12. GOST R 58771-2019 "Menedzhment riska. Tekhnologii otsenki riska" [GOST R 58771-2019 "Risk management. Risk Assessment Technologies"]. Moscow: Standartinform; 2020. 146 p. (In Russ.)
13. Spiridonova A. A., Rudakova V. A., Khomutova E. G. Quality risk management of immunobiological drug production under cultivation conditions. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2019;11(4):54–60. (In Russ.) DOI: 10.17513/np.407.
14. Inspection of health based exposure limit (HBEL) assessments and use in quality risk management: AIDE-memoire PI 052-1. Secretariat of the Pharmaceutical Inspection Convention. 2020. Available at: <http://www.picscheme.org>. Accessed: 08.08.2021.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-159-164>
УДК 347.77:615.2/3



Оригинальная статья / Research article

Процедура взаимного признания при регистрации лекарственных препаратов: новые вызовы или возможности

А. В. Фотеева^{1,2}, О. С. Баршадская¹, Н. Б. Ростова^{1,2*}

¹ ООО «Парма Клиникал», 614113, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Причалная, зд. 16

² ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» (ПГФА), 614081, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

*Контактное лицо: Ростова Наталья Борисовна. E-mail: n-rostova@mail.ru

ORCID: А. В. Фотеева – <https://orcid.org/0000-0002-3752-7848>; О. С. Баршадская – <https://orcid.org/0000-0003-3775-5557>; Н. Б. Ростова – <http://orcid.org/0000-0001-5579-394X>.

Статья поступила: 08.07.2021

Статья принята в печать: 31.01.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Вступление РФ в Евразийский экономический союз в 2014 году и подписание Соглашения о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств открыло новую возможность работы отечественным производителям в части регистрации и вывода в обращение лекарственных препаратов на рынки пяти государств. Однако открытые перспективы, предопределяют как новые задачи к организации такой работы, так и соответствующие компетенции персонала по успешному осуществлению этой деятельности.

Цель. Изучить возможности и преимущества процедуры взаимного признания регистрации лекарственных препаратов как потенциал развития отечественных производителей.

Материалы и методы. В качестве материалов исследования выступали доступные публикации в рецензируемых журналах по тематическим запросам, составленным по ключевым словам выбранной тематики, официальные интернет-сайты, нормативные правовые акты (НПА), регламентирующие порядок регистрации ЛС в ЕС и РФ.

Результаты и обсуждение. Новые подходы к регистрации в рамках Евразийском экономическом союзе (на примере процедуры взаимного признания) рассмотрены с позиции новых возможностей и возникающих проблем для отечественных производителей воспроизведенных лекарственных препаратов. Сравнительный анализ процедуры взаимного признания и национальной процедуры регистрации лекарственных препаратов выявил ряд преимуществ для отечественных производителей, благоприятствующих выводу в обращение лекарственных препаратов на территории ЕАЭС.

Заключение. Обзор процесса гармонизации регистрационной практики лекарственных препаратов в ЕАЭС говорит о перспективности использования процедуры взаимного признания для развития потенциала отечественных производителей и облегчения доступа к эффективным и безопасным препаратам.

Ключевые слова: регистрация лекарственных препаратов, регистрационное удостоверение, процедура взаимного признания, регистрационное досье

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Авторы совместно продумывали концепцию статьи, проводили поиск и сбор фактического материала в доступных публикациях в рецензируемых журналах, официальных интернет-сайтах, нормативно-законодательных актах, писали текст статьи и оформляли его в соответствии с общемедицинским профилем журнала. А. В. Фотеева проверяла статью. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Фотеева А. В., Баршадская О. С., Ростова Н. Б. Процедура взаимного признания при регистрации лекарственных препаратов: новые вызовы или возможности. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):159–164. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-159-164>

Mutual Recognition Procedure for the Registration of Medicines: New Challenges or Opportunities

Alexandra V. Foteeva^{1,2}, Olga S. Barshadskaya¹, Natalya B. Rostova^{1,2*}

¹ LLC "Parma Clinical", bld. 1b, Prichal'naya str., Perm, Perm Territory, 614113, Russia

² Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Poleyaya str., Perm, 614081, Russia

*Corresponding author: Natalya B. Rostova. E-mail: n-rostova@mail.ru

ORCID: Alexandra V. Foteeva – <https://orcid.org/0000-0002-3752-7848>; Olga S. Barshadskaya – <https://orcid.org/0000-0003-3775-5557>; Natalya B. Rostova – <http://orcid.org/0000-0001-5579-394X>.

Received: 08.07.2021

Revised: 31.01.2022

Published: 25.02.2022

Abstract

Introduction. An important task for pharmaceutical manufacturers is to bring high quality, effective and safe medicines to the market. In the event that the country's resources are not enough, drugs that have been successfully registered in other countries come to the rescue.

Aim. To study the possibilities and advantages of the procedure of mutual recognition of registration medicinal products as a potential for the development of domestic producers.

Materials and methods. The materials of the study were available publications in peer-reviewed journals on thematic queries based on keywords of the selected topic, official websites, regulatory legal acts, regulating the procedure for registering medicinal products in the EU and the Russian Federation.

© Фотеева А. В., Баршадская О. С., Ростова Н. Б., 2022

© Foteeva A. V., Barshadskaya O. S., Rostova N. B., 2022

Results and discussion. New approaches to registration within the framework of the Eurasian Economic Union (using the example of the mutual recognition procedure) are considered from the perspective of new opportunities and emerging problems for domestic manufacturers of generic drugs. A comparative analysis of the mutual recognition procedure and the national procedure for registration of medicinal products revealed a number of advantages for domestic manufacturers, favoring the introduction of medicinal products into circulation on the territory of the EAEU.

Conclusion. The review of the process of harmonization of the registration practice of medicinal products in the EAEU speaks of the prospects of using the mutual recognition procedure for developing the potential of domestic manufacturers and facilitating access to effective and safe drugs.

Keywords: registration of medicinal products, registration certificate, mutual recognition procedure, registration dossier

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. The authors jointly thought out the concept of the article, searched for and collected factual material in available publications in peer-reviewed journals, official Internet sites, regulatory and legislative acts, wrote the text of the article and designed it in accordance with the general medical profile of the journal. Alexandra V. Foteeva checked the article. All the authors participated in the discussion of the results.

For citation: Foteeva A. V., Barshadskaya O. S., Rostova N. B. Mutual recognition procedure for the registration of medicines: new challenges or opportunities. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):159–164. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-159-164>

ВВЕДЕНИЕ

Единая процедура допуска на рынок лекарственных средств (ЛС) достаточно распространена в мировой практике, она позволяет снизить стоимость и при этом повысить доступность препаратов. В Европе становление общего фармацевтического рынка началось с 1965 года [1]. Центральную позицию в данной процедуре занимали гармонизация и унификация требований к регистрации ЛС. А основными показателями для оценки являлись утвержденные Европейской комиссией стандарты качества, безопасности и эффективности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материалов исследования выступали доступные публикации в рецензируемых журналах по тематическим запросам, составленным по ключевым словам выбранной тематики, официальные интернет-сайты, нормативные правовые акты (НПА), регламентирующие порядок регистрации ЛС в ЕС и РФ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в Европейском Союзе (ЕС), руководящие документы по регламентации процедуры регистрации ЛС подробно описывают требования к ней: распределение ответственности, обязанности, обеспечение прозрачности и др. Данные требования регулируются двумя ключевыми актами: Директивой Европейского парламента и Совета ЕС 83/2001/ЕС от 6.11.2001 г. о кодексе сообщества о ЛС для применения у человека (Европейский кодекс о ЛС) [2] и Регламентом № 726/2004 Европейского парламента и Совета ЕС, устанавливающий союзные процедуры разрешения и надзора для лекарственных препаратов (ЛП) для медицинского и ветери-

нарного применения и учреждающий Европейское агентство по лекарствам [3], а также прочими документами, входящими в кодекс EudraLex Европейского законодательства.

В целом действующие варианты процедуры регистрации ЛП в ЕС можно разделить на 4 группы [4]:

- ✓ Централизованная процедура.
- ✓ Децентрализованная процедура (процедура, основанная на взаимном признании).
- ✓ Процедура взаимного признания.
- ✓ Национальная процедура (для отдельных групп ЛП).

Централизованная процедура не предназначена для рассмотрения заявок на все виды ЛП: обязательна в отношении особо важных или инновационных ЛП. Важнейшим ее преимуществом является возможность одновременного вывода ЛП на рынки всех стран Союза. Заявка на ЛП подается непосредственно в ЕМА (Европейское агентство ЛС, Амстердам, Нидерланды).

В рамках децентрализованной процедуры заявка на новый ЛП, не имеющий регистрации в Союзе, подается в уполномоченный государственный орган в одной из стран Союза. В дальнейшем данная страна будет выступать в качестве референтной. Референтная страна – страна, расположенная на территории ЕС, в которой впервые зарегистрирован ЛП.

Процедура взаимного признания применяется в тех случаях, когда ЛП уже зарегистрирован хотя бы в одной из стран ЕС. При запуске данной процедуры, рассмотрением заявки и актуализацией экспертного отчета занимается уполномоченный орган референтной страны ЕС. Окончательное решение о регистрации ЛП принимают национальные агентства стран-членов ЕС. Процедура взаимного признания предназначена как для облегчения доступа к единому фар-

мацевтическому рынку, в целях предоставления экспертных ресурсов для научной оценки безопасности, эффективности и качества ЛП, так и в целях охраны здоровья населения.

Основная задача регуляторного органа в данном случае – это разработка документов, включающих единые правила, экономное использование ресурсов, исключение задержек в развитии фармацевтической отрасли, обеспечение доступности новых ЛП при полном соблюдении гарантии качества. Вместе с тем, для достижения этой цели создаются условия, не создающие чрезмерных затруднений в области фармацевтической разработки, испытаний, производства и реализации ЛП.

В РФ порядок и механизм регистрации ЛС осуществляется в соответствии с Федеральным законом «Об обращении лекарственных средств» ФЗ-61 от 12.04.2010 г. [5]; в Республике Беларусь – законом «О лекарственных средствах» от 19.05.2020 г. [6], в Республике Казахстан – кодексом Республики Казахстан «О здоровье народа и системе здравоохранения» (Кодекс) [7], в Республике Армения – законом «О лекарственных средствах» от 13.06.2016 г. [8], в Кыргызской Республике – законом «Об обращении лекарственных средств» от 02.08.2017 г. [9].

В 2014 году в целях гармонизации требований с международными нормами и правилами в отношении трех государств (Беларусь, Казахстан, Россия) было подписано Соглашение о единых принципах и правилах обращения ЛС в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС), к которому позже, в 2016 г. присоединились Армения и Кыргызстан [10]. В связи с подписанием Договора о ЕАЭС (ст. 30), вступившем в силу 01.01.2015 г. появилась основа формирования процедуры регистрации ЛП по требованиям ЕАЭС. Ни в одной из пяти стран ЕАЭС национальные регулирующие органы до данного периода не регламентировали возможность процедуры взаимного признания в целях вывода на фармацевтический рынок ЛП. Регистрация в одном государстве-члене [референтном государстве (РГ)] должна признаваться уполномоченными органами остальных государств-членов (государства признания).

В рамках ЕАЭС можно выстроить следующую иерархию нормативно-правовых актов, регулирующих процесс вывода ЛП на рынок:

- Договор о Евразийском экономическом союзе от 29 мая 2014 г. [11];
- Соглашение о единых принципах и правилах обращения ЛС в рамках ЕАЭС от 23 декабря 2014 г., которое вступило в силу для всех государств-членов 12 февраля 2016 года (Соглашение) [10];
- акты Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) в сфере обращения ЛС, в том числе: Решения Совета ЕЭК, Решения и Рекомендации Коллегии ЕЭК;
- акты государств-членов ЕАЭС – НПА, принимаемые в рамках компетенции, переданной национальным госорганами, или в развитие актов ЕЭК.

В каждой из стран Союза была создана национальная система регистрации ЛС, которая регламентируется соответствующими нормативными документами, действовавшая в РФ до 31.12.2020 г. и до 30.06.2021 г. в остальных государствах-членах ЕАЭС [5–9].

С 2017 года порядок обращения ЛП проходил гармонизацию в рамках Евразийского экономического союза. Одним из важнейших этапов гармонизации является необходимость активно внедрять отдельные надлежащие регуляторные практики.

Пополнению фармацевтического рынка новыми ЛП способствует не столько нормативное регулирование, сколько развитие науки, однако, используя режимы регистрации на основе промежуточных доказательных сведений производители осуществляют ранний доступ определенных категорий пациентов к новейшей терапии. В последние десятилетия подавляющее большинство передовых ЛП регистрировалась на рынках США и ЕС именно с применением процедуры взаимного признания.

С целью выбора наиболее благоприятствующего и перспективного подхода к выбору процедуры регистрации для фармацевтических компаний представляется ценным дать сравнительную оценку процедур регистрации в странах ЕАЭС и национальной процедуры в РФ (действовавшей до 31.12.2020 г.) учитывая сроки, документацию и проводимые экспертизы. Национальная процедура государственной регистрации ЛП в РФ на сегодняшний день упразднена (доступны лишь процедуры внесения изменений и подтверждения регистрации, а также продление срока действия для срочных регистрационных удостоверений в соответствии с законодательством государств-членов ЕАЭС). Результаты сравнительного анализа представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, процедура регистрации и экспертиза ЛП по процедуре взаимного признания обнаруживает существенное преимущество перед национальной и имеет ряд положительных моментов:

- ✓ Срок экспертизы материалов досье при подаче заявителем на государственную регистрацию в референтное государство (РГ) меньше (7 месяцев), чем для аналогичной процедуры в национальном законодательстве (9 месяцев).
- ✓ Процедура регистрации ЛП в рамках взаимного признания осуществляется последовательно в нескольких государствах-членах: уже зарегистрированный на территории одного из государств-членов союза (в референтном государстве) в других государствах-членах подвергается оценке в упрощенном порядке путем анализа экспертного отчета РГ и Модуля 1 Общего технического документа (ОТД). ОТД – это международно-признанный формат составления заявлений и досье, он предназначен для экономии времени и ресурсов, а также содействия регуляторной экспертизе и информированию [12]. При этом государства признания не проводят все экспертизы ЛП заново, а лишь оценивают данные, предоставленные референтным государством (3 месяца).

Таблица 1. Сравнительная таблица процедур регистрации в ЕАЭС и в РФ
Table 1. Comparative table of registration procedures in the EAEU countries and the Russian Federation

С роки регистрации Terms of registration			Необходимые документы Required documents		Процедура экспертизы Examination procedure	
Регистрация по национальной процедуре РФ Registration under the national procedure of the Russian Federation	Регистрация и экспертиза ЛП по процедуре взаимного признания (ГП), РФ) Registration and examination of medicinal products under the procedure of mutual recognition in the state (s) of recognition	Регистрация по процедуре признания в ЕАЭС (референтное государство РФ) Registration under the procedure of mutual recognition in the EAEU (reference state of the Russian Federation)	Регистрация по национальной процедуре РФ Registration under the national procedure of the Russian Federation	Регистрация по национальной процедуре РФ Registration under the national procedure of the Russian Federation	Регистрация по процедуре взаимного признания в ЕАЭС (референтное государство РФ) Registration under the procedure of mutual recognition in the EAEU (reference state of the Russian Federation)	Регистрация и экспертиза ЛП по процедуре взаимного признания (государство) Registration and examination of medicinal products under the procedure of mutual recognition in the state (s) of recognition
160 рабочих дней (без учета времени, необходимого для ответов на запросы) (excluding the time required to respond to requests)	210 календарных дней (без учета времени, необходимого для ответов на запросы) (дополнительно максимально до +180 календарных дней) (excluding the time required to respond to requests [additionally maximum up to +180 calendar days])	Регистрация по процедуре взаимного признания в ЕАЭС (референтное государство РФ) Registration under the procedure of mutual recognition in the EAEU (reference state of the Russian Federation)	Регистрация по процедуре признания в ЕАЭС (референтное государство РФ) Registration under the procedure of mutual recognition in the EAEU (reference state of the Russian Federation)	Регистрация и экспертиза ЛП по процедуре взаимного признания (государство РФ) Registration and examination of medicinal products under the procedure of mutual recognition in the state (s) of recognition	Регистрация по процедуре взаимного признания в ЕАЭС (референтное государство РФ) Registration under the procedure of mutual recognition in the EAEU (reference state of the Russian Federation)	Регистрация и экспертиза ЛП по процедуре взаимного признания (государство) Registration and examination of medicinal products under the procedure of mutual recognition in the state (s) of recognition
160 рабочих дней (без учета времени, необходимого для ответов на запросы) (excluding the time required to respond to requests)	210 календарных дней (без учета времени, необходимого для ответов на запросы) (дополнительно максимально до +180 календарных дней) (excluding the time required to respond to requests [additionally maximum up to +180 calendar days])	Регистрация по процедуре признания в ЕАЭС (референтное государство РФ) Registration under the procedure of mutual recognition in the EAEU (reference state of the Russian Federation)	Регистрация по процедуре признания в ЕАЭС (референтное государство РФ) Registration under the procedure of mutual recognition in the EAEU (reference state of the Russian Federation)	Регистрация и экспертиза ЛП по процедуре взаимного признания (государство РФ) Registration and examination of medicinal products under the procedure of mutual recognition in the state (s) of recognition	Регистрация по процедуре взаимного признания в ЕАЭС (референтное государство РФ) Registration under the procedure of mutual recognition in the EAEU (reference state of the Russian Federation)	Регистрация и экспертиза ЛП по процедуре взаимного признания (государство) Registration and examination of medicinal products under the procedure of mutual recognition in the state (s) of recognition

- ✓ Заявители регистрации могут самостоятельно выбирать референтное государство.

Несмотря на то, что регистрация ЛП в обоих случаях строится на одних и тех же принципах и осуществляется в рамках схожих процедур, существуют отрицательные моменты и определенные отличия, включая порядок взаимодействия государств-членов в рамках единого рынка, которые могут существенно повлиять на обращение ЛС на едином рынке ЕАЭС, а именно:

- ✓ В каждом ГП заявитель уплачивает госпошлину за регистрацию, перерегистрацию, внесение изменений.
- ✓ В отношении воспроизведенных ЛП отсутствует ускоренная процедура регистрации, однако возможна упрощенная процедура проведения биоэквивалентности (биоэвейвер).
- ✓ Процедура решения разногласий между заявителем и экспертными (уполномоченными) органами государств-членов на этапе прохождения регистрационных процедур регламентирована, однако практики правоприменения нет [13].
- ✓ Понятие взаимозаменяемости применимо только на национальном уровне в РФ.

При этом публичными стали экспертные отчеты оценки ЛП уполномоченными органами ЕАЭС, размещенные в единой информационной системе Союза – это делает процедуру регистрации ЛП в ЕАЭС прозрачной [14].

Новые выгоды регистрации и вывода ЛП на фармацевтический рынок по процедуре ЕАЭС определяют новую необходимость развития работы отдела по работе с регуляторными органами для производителей, заявителей, держателей регистрационных удостоверений. Одной из основных задач для них при этом становится реорганизация деятельности и развития профессиональных компетенций по вопросам регистрации ЛП и вывода их на фармацевтические рынки, путем обучения персонала и формированием новой базы стандартных операционных процедур в рамках системы менеджмента качества организации, основанной на новых нормативно-правовых актах ЕАЭС. Новые требования должны привести к сокращению времени и ресурсов, затрачиваемых на составление регистрационных досье на ЛП путем стандартизации общих элементов документации, подачи их в электронном формате. Таким образом, при инициации любых процедур регистрации ЛП упрощается взаимодействие с уполномоченными органами, что в свою очередь упрощает процесс обмена регуляторной информацией между уполномоченными органами государств-членов ЕАЭС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гармонизация практики регистрации ЛП в ЕАЭС с международной практикой в соответствии с требованиями времени – обязательным соблюдением надлежащих практик (GxP), документами регистрацион-

ного досье, подготовленного в формате ОТД приведет к созданию условий для обращения в Союзе безопасных, качественных и эффективных ЛП, снизит барьеры, связанные с особенностями национальных фармацевтических рынков. У отечественных производителей появится больше возможностей выхода на внешние рынки, география экспорта определяется входящими в состав ЕАЭС странами. Унификация документов, входящих в состав регистрационного досье (формат ОТД), предоставляет возможность производителю ЛС инициировать любые процедуры регистрации в странах, использующих подходы ЕС и ICH к регулированию доступа ЛП на рынок.

Таким образом, укрепление экономик государств-членов ЕАЭС, развитие кооперации между странами, повышение конкурентоспособности фармацевтической продукции на мировом рынке товаров и услуг, а также создание единого рынка ЛС, осуществляется путем повышения совершенствования регуляторных практик, обеспечивающих вывод на рынок ЛП качество, эффективность и безопасность которых оценивается на основе наилучших мировых практик [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Regulating pharmaceuticals in Europe. Available at: <https://www.euro.who.int/> Accessed: 14.09.2021.
2. Директива 2001/83/ЕС Европейского парламента и Совета ЕС от 6.11.2001 «О своде законов Сообщества в отношении лекарственных препаратов для человека».
3. Регламент (ЕС) № 726/2004 Европейского парламента и Совета от 31 марта 2004 г., устанавливающий союзные процедуры разрешения и надзора для лекарственных препаратов для медицинского и ветеринарного применения и учреждающий Европейское агентство по лекарствам. Доступно по: <https://base.garant.ru/2570581/> Ссылка активна на 05.05.2021.
4. EMA. Available at: <https://www.ema.europa.eu/> Accessed: 05.05.2021.
5. Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Доступно по: <https://base.garant.ru/12174909/> Ссылка активна на 05.05.2021.
6. Закон Республики Беларусь от 20 июля 2006 г. № 161-З «О лекарственных средствах». Доступно по: https://belzakon.net/Законодательство/Закон_РБ/2006/794. Ссылка активна на 05.05.2021.
7. Кодекс Республики Казахстан от 7 июля 2020 г. № 360-VI «О здоровье народа и системе здравоохранения». Доступно по: https://kodeksy-kz.com/ka/o_zdorove_naroda_i_sisteme_zdravoohraneniya.htm. Ссылка активна на 05.05.2021.
8. Закон Республики Армения от 13 июня 2016 г. № 3Р-86 «О лекарственных средствах». Доступно по: https://base.spininform.ru/show_doc.fwx?rgn=89529. Ссылка активна на 05.05.2021.
9. Закон Кыргызской Республики от 2 августа 2017 г. № 165 «Об обращении лекарственных средств». Доступно по: <http://cbd.minjust.gov.kg/act/view/ru-ru/111672>. Ссылка активна на 05.05.2021 г.
10. Соглашение о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза от 23 декабря 2014 г. Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/0147061/itia_24122014. Ссылка активна на 27.07.2021.
11. Договор о Евразийском экономическом союзе от 29 мая 2014 г. Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/0043610/itia_05062014. Ссылка активна на 27.07.2021 г.
12. Ремедиум от 30.03.2020 г. Доступно по: <https://remedium.ru/> Ссылка активна на 14.09.2021.
13. Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 75 «Об утверждении Положения об Экспертном комитете по лекарственным средствам» от 03.11.2016 г. Доступно по: <http://www.eurasiancommission.org/> Ссылка активна на 24.09.2021.

14. Российская газета от 09.12.2019 г. Доступно по: <https://rg.ru/> Ссылка активна на 14.09.2021 г
15. Сайт Евразийской экономической комиссии. Доступно по: <http://www.eurasiancommission.org/> Ссылка активна на 14.09.2021.

REFERENCES

1. Regulating pharmaceuticals in Europe. Available at: <https://www.euro.who.int/> Accessed: 14.09.2021.
2. *Direktiva 2001/83/ES Evropeyskogo parlamenta i Soveta ES ot 6.11.2001 "O svode zakonov Soobshchestva v otnoshenii lekarstvennykh preparatov dlya cheloveka"* [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 the human use]. (In Russ.)
3. *Reglament (EC) № 726/2004 Evropeyskogo parlamenta i Soveta ot 31 marta 2004 g., ustanavlivayushchiy soyuznye protsedury razresheniya i nadzora dlya lekarstvennykh preparatov dlya meditsinskogo i veterinarnogo primeneniya i uchrezhdayushchiy Evropeyskoe agentstvo po lekarstvam* [Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency]. Available at: <https://base.garant.ru/2570581/> Accessed: 05.05.2021. (In Russ.)
4. EMA. Available at: <https://www.ema.europa.eu/> Accessed: 05.05.2021.
5. *Federal'nyy zakon ot 12.04.2010 g. № 61-FZ "Ob obrashchenii lekarstvennykh sredstv"* [Federal Law No. 61-FZ of 12.04.2010 "On the Circulation of Medicines"]. Available at: <https://base.garant.ru/12174909/> Accessed: 05.05.2021. (In Russ.)
6. *Zakon Respubliki Belarus' ot 20 iyulya 2006 g. № 161-Z "O lekarstvennykh sredstvakh"* [Law of the Republic of Belarus dated July 20, 2006 No. 161-3 "On Medicines"]. Available at: https://belzakon.net/Zakonodatelstvo/Zakon_RB/2006/794. Accessed: 05.05.2021. (In Russ.)
7. *Kodeks Respubliki Kazakhstan ot 7 iyulya 2020 g. № 360-VI "O zdorov'e naroda i sisteme zdravookhraneniya"* [Code of the Republic of Kazakhstan dated July 7, 2020 No. 360-VI "On people's health and the health care system"]. Available at: https://kodeksy-kz.com/ka/o_zdorove_naroda_i_sisteme_zdravookhraneniya.htm. Accessed: 05.05.2021. (In Russ.)
8. *Zakon Respubliki Armeniya ot 13 iyunya 2016 g. № ZR-86 "O lekarstvennykh sredstvakh"* [Law of the Republic of Armenia dated June 13, 2016 No. 3P-86 "On Medicines"]. Available at: https://base.spininform.ru/show_doc.fwx?rgn=89529. Accessed: 05.05.2021. (In Russ.)
9. *Zakon Kyrgyzskoy Respubliki ot 2 avgusta 2017 g. № 165 "Ob obrashchenii lekarstvennykh sredstv"* [Law of the Kyrgyz Republic dated August 2, 2017 No. 165 "On the Circulation of Medicines"]. Available at: <http://cbd.minjust.gov.kg/act/view/ru-ru/111672>. Accessed: 05.05.2021. (In Russ.)
10. *Soglasenie o edinykh printsipakh i pravilakh obrashcheniya lekarstvennykh sredstv v ramkakh Evraziyskogo ekonomicheskogo soyuza ot 23 dekabrya 2014 g.* [Agreement on common principles and rules for the circulation of medicines within the Eurasian Economic Union dated December 23, 2014]. Available at: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/0147061/itia_24122014. Accessed: 05.05.2021. (In Russ.)
11. *Dogovor o Evraziyskom ekonomicheskom soyuze ot 29 maya 2014 g.* [Treaty on the Eurasian Economic Union dated May 29, 2014]. Available at: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/0043610/itia_05062014. Accessed: 27.07.2021. (In Russ.)
12. *Remedium ot 30.03.2020 g.* [Remedium from 30.03.2020]. Available at: <https://remedium.ru/> Accessed: 14.09.2021. (In Russ.)
13. *Reshenie Soveta Evraziyskoy ekonomicheskoy komissii № 75 "Ob utverzhdenii Polozheniya ob Ekspertnom komitete po lekarstvennym sredstvam" ot 03.11.2016 g.* [Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission No. 75 of 03.11.2016 "On approval of the Regulation on the Expert Committee on Medicines" Available at: <http://www.eurasiancommission.org/> Accessed: 24.09.2021. (In Russ.)
14. *Rossiyskaya gazeta ot 09.12.2019 g.* [Russian newspaper dated 09.12.2019]. Available at: <https://rg.ru/> Accessed: 14.09.2021. (In Russ.)
15. *Sayt Evraziyskoy ekonomicheskoy komissii* [Website of the Eurasian Economic Commission]. Available at: <http://www.eurasiancommission.org/> Accessed: 14.09.2021. (In Russ.)

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-165-173>
УДК 614.35; 615.013



Обзорная статья / Review article

Организация гигиенического мониторинга загрязненности воздуха рабочей зоны твердыми частицами на фармацевтических предприятиях (обзор)

И. А. Пожарнов, А. С. Симаков, А. А. Шатилина*, Г. В. Раменская

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

*Контактное лицо: Шатилина Анастасия Андреевна. E-mail: shatilina_a_a@staff.sechenov.ru

ORCID: И. А. Пожарнов – <https://orcid.org/0000-0002-5721-1883>; А. С. Симаков – <https://orcid.org/0000-0002-3076-0030>; А. А. Шатилина – <https://orcid.org/0000-0001-9910-9097>; Г. В. Раменская – <https://orcid.org/0000-0001-8779-3573>.

Статья поступила: 17.01.2022

Статья принята в печать: 18.02.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Использование высокоактивных субстанций различного происхождения на предприятиях фармацевтической промышленности подвергает риску персонал, работающий непосредственно с активными фармацевтическими субстанциями (АФС) в производственных помещениях. Несмотря на выполнение фармацевтическими предприятиями требований по охране труда, в частности использование средств индивидуальной защиты (СИЗ) и проведение манипуляций с высокотоксичными веществами в специально предназначенных для этого помещениях, влияние факторов риска на состояние здоровья операторов необходимо регулярно оценивать и контролировать. В связи с этим гигиенический мониторинг воздуха рабочей зоны является обязательным мероприятием в деятельности фармацевтических предприятий. В настоящее время на территории Российской Федерации действует ряд нормативных документов (приказов, государственных стандартов, методических указаний, руководств), определяющих единые требования к организации и проведению контроля загрязненности воздуха рабочей зоны твердыми частицами. Вместе с тем, на законодательном уровне обязательным требованием для всех производственных предприятий является разработка соответствующих индивидуальных методик для определения содержания конкретных веществ в воздухе рабочей зоны.

Текст. В данной статье приведен обзор российской и зарубежной нормативной базы по вопросу порядка организации и проведения гигиенического мониторинга воздуха рабочей зоны. На основе сравнительного анализа приведенной литературы, с целью выявления общих положений, описан подход к проведению контроля содержания вредных веществ в воздухе рабочей зоны на фармацевтических предприятиях.

Заключение. В результате сравнительного анализа рассмотренных литературных данных представлен общий подход к контролю за содержанием вредных веществ в воздухе рабочей зоны, включающий в себя описание необходимого оборудования и материалов для отбора проб, стратегию проведения пробоотбора, рекомендации по оформлению протоколов мониторинга, порядок хранения и транспортировки проб, а также процедуру проведения анализа проб. Данная работа может служить в качестве возможного опорного материала для разработки фармацевтическими предприятиями индивидуальных требований к методике определения концентрации конкретных веществ в воздухе рабочей зоны.

Ключевые слова: гигиенический мониторинг, воздух рабочей зоны, предельно допустимая концентрация, фармацевтические предприятия, охрана труда

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. И. А. Пожарнову принадлежит идея, концепция, планирование и структура работы, обеспечение производственного процесса. А. С. Симаков и А. А. Шатилина провели сбор и анализ материала, подготовили текст статьи. Г. В. Раменская выполняла общее руководство, научное консультирование и редактирование статьи.

Для цитирования: Пожарнов И. А., Симаков А. С., Шатилина А. А., Раменская Г. В. Организация гигиенического мониторинга загрязненности воздуха рабочей зоны твердыми частицами на фармацевтических предприятиях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):165–173. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-165-173>

Organization of Hygienic Monitoring of Working Area Air Pollution by Particulates in Pharmaceutical Industries (Review)

Igor A. Pozharnov, Alexey S. Simakov, Anastasia A. Shatilina*, Galina V. Ramenskaya

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: Anastasia A. Shatilina. E-mail: shatilina_a_a@staff.sechenov.ru

ORCID: Igor A. Pozharnov – <https://orcid.org/0000-0002-5721-1883>; Alexey S. Simakov – <https://orcid.org/0000-0002-3076-0030>; Anastasia A. Shatilina – <https://orcid.org/0000-0001-9910-9097>; Galina V. Ramenskaya – <https://orcid.org/0000-0001-8779-3573>.

Received: 17.01.2022

Revised: 18.02.2022

Published: 25.02.2022

Abstract

Introduction. The use of highly active substances of various origins in the pharmaceutical industry exposes employees working directly with active pharmaceutical substances (APS) in manufacturing facilities to risks. Although pharmaceutical companies follow occupational safety requirements, such as the use of personal protective equipment (PPE), the manipulation of highly toxic substances in specially dedicated indoor facilities, etc.,

© Пожарнов И. А., Симаков А. С., Шатилина А. А., Раменская Г. В., 2022

© Pozharnov I. A., Simakov A. S., Shatilina A. A., Ramenskaya G. V., 2022

the impact of risk factors on the health of workers must be regularly assessed and monitored. Therefore, hygienic monitoring of working area air is obligatory in activity of pharmaceutical enterprises. A range of normative documents (orders, State standards, methodological guidelines, manuals) are currently in force in the Russian Federation defining uniform requirements for the organization and monitoring of working area air pollution by particulates. At the same time, the development of appropriate adjusted methodologies for determining the content of a specific substance in working area air is a mandatory requirement for all manufacturing enterprise by legislation.

Text. The article provides a review of the Russian regulatory framework and relevant literature sources relating to the order of organization and performance of hygienic monitoring of working area air, including foreign ones. On the basis of a comparative analysis of the aforementioned literature completed in order to reveal common provisions, the comprehensive methodology for the monitoring of the content of harmful substances in the working area air at pharmaceutical enterprises is described.

Conclusion. As a result of a comparative analysis of the literature reviewed, a detailed comprehensive methodology for the monitoring of the content of harmful substances in the working area air is presented, including a description of the equipment and materials required for sampling, sampling strategies, recommendations for monitoring protocols, procedures for storage and transport of samples, and procedure for sample analysis. This article may serve as a possible reference for pharmaceutical enterprises to develop individual methodologies for determining the concentration of a specific substances in working area air.

Keywords: hygienic monitoring, working area air, maximum allowable concentration, pharmaceutical enterprises, labor protection

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Igor A. Pozharnov owns the idea, concept, planning and structure of work, ensuring the production process. Alexey S. Simakov and Anastasia A. Shatilina collected and analyzed the material, prepared the text of the article. Galina V. Ramenskaya performed general guidance, scientific consulting and editing of the article.

For citation: Pozharnov I. A., Simakov A. S., Shatilina A. A., Ramenskaya G. V. Organization of hygienic monitoring of working area air pollution by particulates in pharmaceutical industries. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):165–173. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-165-173>

ВВЕДЕНИЕ

Активные фармацевтические субстанции (АФС), используемые в технологическом процессе производства фармацевтической продукции, созданы исключительно для оказания определенного фармакологического эффекта. Данный эффект необходим для терапии пациентов, страдающих определенным заболеванием, однако для операторов, работающих в производственных помещениях фармацевтических предприятий, он имеет вредоносный характер [1–6]. Кроме того, подавляющее большинство лекарственных средств (ЛС) наряду с основным фармакологическим эффектом также оказывают токсическое действие, сила которого увеличивается с повышением дозы ЛС [7]. Для обеспечения безопасности здоровья персонала на фармацевтических предприятиях используются средства индивидуальной защиты (СИЗ), включая СИЗ органов дыхания (СИЗОД), а также специальные боксы для работы с высокотоксичными веществами [8, 9]. Помимо этого, все производственные помещения специально проектируют для уменьшения риска воздействия вредных веществ на организм сотрудников предприятия (СП 4079-86). Для оценки и контроля данного риска необходимо проводить гигиенический мониторинг воздуха рабочей зоны в производственных помещениях [10–12].

На сегодняшний день на территории России действует ряд приказов, ГОСТов, методических ука-

заний (МУ) и руководств, касающихся гигиенического мониторинга воздуха рабочей зоны и устанавливающих единые требования к проведению данного мероприятия (ГОСТ 12.1.016–79, ГОСТ Р 54578–2011, ГОСТ Р ИСО 15767–2012, МУ 4945–88, МУК 4.1.2468–09, Р 2.2.2006–05), в частности на предприятиях фармацевтической промышленности (МУ 1.1.726–98). Тем не менее, разработка и утверждение соответствующих индивидуальных методик для каждого конкретного вещества является обязательным законодательным требованием для всех производственных предприятий.

Таким образом, настоящий обзор посвящен вопросу организации и проведения гигиенического мониторинга загрязненности воздуха рабочей зоны твердыми частицами на фармацевтических предприятиях.

Порядок оценки загрязненности воздуха рабочей зоны

В рамках государственного регулирования основным критерием оценки загрязненности воздуха рабочей зоны является предельно допустимая концентрация вредных веществ в воздухе рабочей зоны (ПДК_{рз}) (ГН 2.2.5.1313–03) или, если норма ПДК не установлена, то утверждается временный норматив – ориентировочный безопасный уровень воздействия (ОБУВ) вредных веществ в воздухе рабочей зоны (ГН 2.2.5.2308–07). Оба критерия определяются

по токсикометрическим параметрам и физико-химическим свойствам веществ (МУ 4000–85) [13]. ПДК_{рз} измеряется в мг/м³ и определяется как концентрация, которая при ежедневной (кроме выходных дней) работе в течение 8 ч и не более 40 ч в неделю, в течение всего рабочего стажа не должна вызывать заболеваний или отклонений в состоянии здоровья, обнаруживаемых современными методами исследования в процессе работы или в отдаленные сроки жизни нынешнего и последующего поколений (ГН 2.2.5.686–98). Рабочей зоной считается пространство высотой до 2 м над уровнем пола или площадки, на котором находятся места постоянного или временного пребывания работающих (ГН 2.2.5.686–98). В соответствии с Р 2.2.755–99 выделяют два основных вида ПДК_{рз}:

- среднесменная ПДК (ПДК_{сс.рз}) – предельная концентрация, усредненная за 8-часовую рабочую смену;
- максимальная ПДК (ПДК_{м.рз}) – максимальная концентрация, возникающая при ведении технологического процесса, усредненная при отборе проб за промежуток времени, равный 15 мин.

На основании ПДК_{рз} осуществляется отнесение условий труда к определенному классу (подклассу) (приказ № 33н от 24 января 2014 г.). Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать ПДК_{рз} (ГОСТ 12.1.005–88), а в случае его превышения должно быть проведено расследование (СП 4079–86). Таким образом, гигиенический мониторинг воздуха рабочей зоны на фармацевтическом предприятии позволяет обеспечивать контроль за превышением ПДК_{рз}. Однако, это не единственная причина организации гигиенического мониторинга.

Причины проведения гигиенического мониторинга воздуха рабочей зоны

Гигиенический мониторинг воздуха рабочей зоны позволяет оценить загрязненность воздуха вредными веществами, что в свою очередь необходимо для следующих мероприятий:

- соблюдение нормативов ПДК и внутриорганизационных стандартов;
- создание и учреждение внутриорганизационных стандартов;
- проверка эффективности мер по предотвращению загрязнения на производстве;
- создание мер по предотвращению загрязнения на производстве;
- проверка новых технологических процессов;
- проведение эпидемиологических исследований [14];
- информирование персонала о загрязненности их рабочей зоны и об уровне риска;
- определение необходимых СИЗ и СИЗОД;
- определение необходимости наблюдения за состоянием здоровья сотрудников [15];
- страхование [16].

Проведение гигиенического мониторинга воздуха рабочей зоны на фармацевтических предприятиях

Гигиенический мониторинг воздуха включает в себя два взаимосвязанных этапа – пробоотбор и анализ проб. Пробоотбор заключается в отборе проб аналита из известного объема воздуха (в случае проб воздуха) или сбор проб аналита с поверхности известной площади (в случае смывов с поверхности), а также в обеспечении сохранности аналита с помощью носителя до проведения анализа. Собственно, анализ состоит из смыва аналита с носителя и его последующего количественного определения подходящим методом.

Пробоотбор. Для отбора проб воздуха необходимо подготовить устройство для пробоотбора, состоящее из нескольких элементов:

- ✓ Портативный насос для аспирации воздуха через все пробоотборное устройство¹. Насос является конечным звеном пробоотборника, питается от батареи, должен быть легким и не мешать оператору при работе [15]. Скорость потока воздуха (мл/мин), обеспечиваемая насосом, зависит от определяемого вещества и должна быть указана в соответствующей методике. Стоит отметить, что объем отбираемого воздуха зависит от содержания в нем определяемого вредного вещества: чем меньше содержание вещества, тем, соответственно, больший объем воздуха требуется. Важно также понимать, что скорость потока воздуха, отображаемая на дисплее насоса, не должна приниматься за точно установленную и в связи с этим использоваться в расчетах. Для определения точного значения скорости потока воздуха необходима калибровка насоса.
- ✓ Калибратор, позволяющий установить точную скорость потока воздуха, проходящего через устройство для пробоотбора. Существуют калибраторы разного принципа действия: основанные на движении мыльной плёнки, электрические поршневые и ротаметры [15]. При проведении гигиенического мониторинга воздуха наиболее часто используются первые два, так как они отличаются большей точностью. Калибраторы также подвергаются ежегодной калибровке². Калибровка насосов для отбора проб проводится в начале и в конце смены/периода взятия проб³ [17], что позволяет узнать действительную скорость по-

¹ Dolet D., Beauchamp G. Sampling Guide for Air Contaminants in the Workplace. Available at: <http://www.irsst.qc.ca/media/documents/PubIRSSST/T-15.pdf>. Accessed: 24.08.2020.

² OSHA Technical Manual (OTM) Section II Chapter 1 – Personal Sampling for Air Contaminants. Available at: https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_ii/otm_ii_1.html. Accessed: 24.08.2020.

³ Там же.

тока воздуха, необходимую для расчета концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны. Поэтому важно крайне ответственно и с особой осторожностью относиться к калибровке насоса [15].

- ✓ Пробоотборник, который по своей сути выполняет роль держателя фильтра и с насосом соединен с помощью трубок. Таким образом пробоотборник является начальным звеном устройства для пробоотбора. Существует множество типов пробоотборников различной конструкции, при этом общепринятого типа не установлено [18]. Наиболее используемым среди них для гигиенического мониторинга воздуха на фармацевтическом предприятии является пробоотборник IOM, разработанный в Институте Гигиены Труда (Institute of Occupational Medicine, Эдинбург, Соединенное Королевство) [19], в котором используются фильтры с диаметром пор 25 мм [20, 21].
- ✓ Фильтр, который закрепляется в пробоотборнике таким образом, чтобы было возможно аспирировать твердые частицы, находящиеся в воздухе в момент отбора пробы. Фильтры могут быть изготовлены из различных материалов [22, 23]. Фильтр подбирается исходя из свойств определяемого вредного вещества, поскольку использование неподходящего фильтра может привести к ошибкам в результатах, что, ко всему прочему, также является одной из причин, обуславливающих необходимость разработки индивидуальной методики [15, 24, 25]. Фильтры, изготовленные, соответственно, из сложных эфиров целлюлозы, политетрафторэтилена и поливинилхлорида, обладают наибольшей эффективностью удержания частиц [26] и, поэтому наиболее часто используются для целей гигиенического мониторинга воздуха.
- ✓ Транспортировочная клипса, предназначенная для хранения и транспортировки фильтра, содержащего аналит. Как правило используется специальная клипса, предохраняющая его от нежелательной контаминации.
- ✓ Соединительные трубки, которые как уже было упомянуто выше, используются для обеспечения контакта между насосом и пробоотборником, а также для присоединения насоса к калибратору на стадии калибровки. Трубки должны обладать достаточной прочностью и гибкостью во избежание утечки и для обеспечения комфортных условий работы оператора¹.

Резюмируя вышеизложенное, устройство для пробоотбора представляет собой откалиброванный портативный насос, соединенный трубками с пробоотборником, несущим соответствующий аналиту

фильтр. В рабочем режиме насоса, все твердые частицы, находящиеся в воздухе рабочей зоны, концентрируются на фильтре. Фильтр затем помещают в транспортную клипсу, на которой указывают номер отобранной пробы.

Стоит также отметить, что при принятии решения об использовании конкретного устройства для отбора проб независимо от его принципа действия целесообразно проводить оценку эффективности его работы соответствующими валидированными методами (ГОСТ Р ЕН 13205–2010), на основании чего в дальнейшем делают вывод о соответствии специфических характеристик данного пробоотборника установленным нормативам (ГОСТ Р 59670–2021).

По типу пробоотбора выделяют:

- ✓ Персональные пробы, которые служат для измерения уровня вредных веществ в рабочей зоне конкретного оператора без СИЗОД во время работы в производственном помещении [15]. Устройство для пробоотбора закрепляется на одежде работника на весь период отбора проб, причем пробоотборник располагается непосредственно в зоне дыхания оператора – на расстоянии 20–30 см от носа и рта², либо с максимальным приближением к ней – на высоте 1,5 м от пола при работе стоя и 1 м – при работе сидя (Р 2.2.2006–05). Если персонал использует СИЗОД, то пробоотборник крепится с наружной стороны СИЗОД. Поскольку СИЗОД не в полной мере способен обеспечить защиту органов дыхания человека [27], то для оценки воздействия вредных веществ на работника, использующего СИЗОД, целесообразно разместить пробоотборник с внутренней стороны СИЗОД, однако это не представляется возможным для СИЗОД без принудительной подачи воздуха, так как в таком случае нарушается область обтюрации, обеспечивающая основную защиту органов дыхания работника.

Существует два подхода к отбору персональных проб. Первый подход подразумевает под собой установку устройства для пробоотбора на одежде оператора, наиболее подверженного воздействию вредных веществ. Таким образом, если в результате будет установлено, что данный работник не подвержен значительному воздействию вредных веществ в воздухе рабочей зоны, можно будет сделать вывод о том, что остальные работники также не будут ему подвергаться. При другом подходе отбор проб производится при размещении устройства для отбора проб на одежде всех присутствующих в рабочей зоне операторов³.

² Monitoring strategies for toxic substances. Available at: <https://www.hse.gov.uk/pubns/priced/hsg173.pdf>. Accessed: 24.08.2020.

³ BS EN 689:1996; Leidel N. A., Busch K. A., Lynch J. R. Occupational Exposure Sampling Strategy Manual, NIOSH Publication. Available at: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/77-173/pdfs/77-173.pdf?id=10.26616/NIOSH-PUB77173>. Accessed: 24.08.2020.

¹ OSHA Technical Manual (OTM) Section II Chapter 1 – Personal Sampling for Air Contaminants. Available at: https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_ii/otm_ii_1.html. Accessed: 24.08.2020.

- ✓ Стационарные пробы, которые служат для измерения уровня вредных веществ в воздухе в определенной части рабочей зоны. Как правило, стационарные пробы не могут быть использованы для оценки воздействия вредных веществ на персонал, так как операторы часто перемещаются по всей территории рабочей зоны, то есть они не подвержены в течение продолжительного времени воздействию вредных веществ, содержащихся в определенной точке рабочей зоны [15]. Но стационарные пробы могут быть использованы для определения и оценки возможных источников загрязнения воздуха¹. Точку для установки устройства для отбора стационарной пробы выбирают исходя из поставленной задачи (оценка источников загрязнения воздуха и выявление потенциально опасных участков рабочей зоны; оценка эффективности работы вентиляционной системы; мониторинг фактического содержания вредных веществ и установление их соответствия максимальным или среднесменным ПДК) (Р 2.2.2006–05).

Выбор стратегии пробоотбора зависит от поставленной задачи, решение которой обеспечивает проведение гигиенического мониторинга. Существует два основных варианта отбора проб: долгосрочный и краткосрочный [28, 29].

Долгосрочный пробоотбор проводится в течение 6–12 часов с целью определения среднего уровня воздействия вредных веществ на персонал за рабочую смену [17]. При этом непосредственно пробоотбор может быть выполнен как отбором одной пробой в течение полной рабочей смены, так и серией последовательного отбора проб, покрывающих весь рабочий период или его часть². Количество проб зависит от длительности отбора одной пробы, числа технологических операций, их продолжительности. В таблице 1 приведено рекомендуемое минимальное число проб в зависимости от продолжительности пробоотбора (Р 2.2.2006–05).

Краткосрочный пробоотбор применяется для определения непродолжительного по времени увеличения уровня воздействия или пика воздействия вредных веществ во время рабочей смены. Например, при завышенных показаниях долгосрочных проб, краткосрочный пробоотбор помогает выявить конкретный источник или причину данного изменения. Как правило, длительность краткосрочного пробоотбора для химических веществ составляет

15 минут, а для аэрозолей преимущественно фиброгенного действия (АПФД) – 30 мин. При определении концентрации раздражающих веществ или веществ, вызывающих острое отравление при их непродолжительном воздействии, время пробоотбора должно быть максимально сокращено, насколько позволяет метод определения вещества (Р 2.2.2006–05). Для точного отбора краткосрочных проб необходимо иметь подробное понимание используемой технологии, применяемого оборудования и методики производства, так как требуется определить наиболее вероятное место, время и кратность возникновения возможного повышения концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны [30].

Таблица 1. Количество проб в зависимости от продолжительности отбора одной пробы

Table 1. The number of samples depending on the duration of one sampling

Продолжительность отбора одной пробы Duration of sampling per sample	Минимальное количество проб Minimum number of samples
До 10 секунд Up to 10 seconds	30
От 10 секунд до 1 минуты 10 seconds to 1 minute	20
От 1 до 5 минут 1 to 5 minutes	12
От 5 до 15 минут 5 to 15 minutes	4
От 30 минут до 1 часа 30 minutes to 1 hour	3
От 1 до 2 часов 1 to 2 hours	2
Более 2 часов More than 2 hours	1

Примечание. Р 2.2.2006–05. 2.2. Гигиена труда. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 29.07.2005).

Note. R 2.2.2006–05. 2.2. Labor hygiene. Guidelines for the hygienic assessment of factors of the working environment and the labor process. Criteria and classification of working conditions (approved by the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation on July 29, 2005).

Для оценки загрязнения воздуха также используют смывы с поверхностей (мебели, оборудования, пола и других) на которых могут оседать частицы вредных веществ из воздуха. Для этого используют свабы, которые представляют собой стерильные зонд-тампоны, предназначенные для взятия проб на анализ. Сваб состоит из тканевой головки, выполняющей функцию носителя пробы, и держателя. Материал для изготовления головки подбирается в зависимости от аналита. Наиболее распространенные материалы – хлопок, вискоза, дакрон. В некоторых случаях сваб может быть заменен стерильной салфеткой. Перед пробоотбором, головку сваба смачивают

¹ Monitoring strategies for toxic substances. Available at: <https://www.hse.gov.uk/pubns/priced/hsg173.pdf>. Accessed: 24.08.2020.

² Leidel N. A., Busch K. A., Lynch J. R. Occupational Exposure Sampling Strategy Manual, NIOSH Publication. Available at: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/77-173/pdfs/77-173.pdf?id=10.26616/NIOSH-PUB77173>. Accessed: 24.08.2020.

растворителем, затем проводят смыв с заранее выбранной поверхности. Растворитель также подбирается исходя из свойств аналита. Как правило, это дистиллированная вода или этанол¹.

При отборе проб используют трафарет. Трафарет представляет собой бумажную рамку квадратной формы шириной 2 см и внутренней стороной квадрата 10 см, следовательно, площадь внутреннего квадрата рамки составляет 100 см², что соответствует усредненной площади ладони человека². Таким образом, трафарет определяет площадь смыва с поверхности – 100 см². Для хранения и транспортировки пробы на носителе до проведения анализа применяют пробирку или «зип-лок» пакет.

Таким образом, выполнение смыва с поверхности, площадь которой, как правило, равняется 100 см², осуществляется с использованием сваба, смоченного в соответствующем аналиту растворителе. После смыва сваба с отобранной пробой герметично закрывают в пробирке/«зип-лок» пакете, на которой указывают номер пробы³ [32].

Пробоотбор производится в конце смены, или в конце технологического процесса. Выбор места для смыва проводится по локальным актам предприятия или в наиболее загрязненном месте. Возможно взятие смывов с СИЗОД, а также рук операторов для оценки уровня вредных веществ, попавших на кожу работника без СИЗ [33]. Нормативами для оценки допустимого содержания аналита в смывах с поверхностей являются внутриорганизационные стандарты. Единица измерения концентрации аналита для смывов с поверхности – мг/100 см².

Важнейшей составляющей мониторинга является ведение записей во время пробоотбора, позволяющих в дальнейшем правильно интерпретировать результаты анализа. Требования к оформлению протоколов проведения разных видов контроля загрязненности воздуха указаны в Приложении 9 Р 2.2.2006–05. Протоколы проведения гигиенического мониторинга воздуха рабочей зоны обязательно должны содержать следующую информацию: дату отбора пробы; количество проб и длительность (начало и окончание) отбора проб; название технологического процесса, сопряженного с отбором проб; ФИО оператора, на котором установлено устройство для отбора персональной пробы или, в случае отбора стационарной

пробы, подробное описание точки установки устройства для пробоотбора; фиксирование (желательно посредством фотофиксации) действий операторов, повлекших за собой возможное увеличение содержания вредных веществ в воздухе рабочей зоны⁴ [17]. На некоторых предприятиях для облегчения ведения записей проведения гигиенического мониторинга воздуха рабочей зоны разработаны и утверждены специальные формы протоколов.

Если лаборатория, ответственная за анализ проб, находится вне предприятия, как например при аутсорсинге, то необходимо обеспечить надлежащие условия хранения и транспортировки проб до места проведения анализа. Как было описано выше, пробы отобранного воздуха хранятся и транспортируются в специальных клипсах, а смывы с поверхности в пластиковых пробирках или полиэтиленовых пакетах. Указанные меры необходимы для предотвращения контаминации пробы и обеспечения ее физической и химической целостности до проведения анализа (ГОСТ Р 59670–2021). Для предупреждения деградации проб их хранение и перевозку осуществляют в специальных условиях, зависящих напрямую от свойств аналита. К таким условиям относятся температура и относительная влажность, а также состояние вещества при хранении (в твердом виде или в растворе). Условия хранения и транспортировки проб устанавливаются внутриорганизационными стандартами на каждое конкретное вещество.

Анализ проб. После доставки в аналитическую лабораторию пробы смывают с носителя соответствующим растворителем, указанным в индивидуальной методике на определяемое вещество [34], после чего проводят количественный анализ. Особенность количественного анализа проб воздуха и, в некоторой степени, смывов с поверхности состоит в том, что концентрация вредных веществ в воздухе находится на уровне следовых количеств, поэтому для количественного определения используют высокочувствительные физико-химические методы, как правило, хроматографические – газовую или высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС или ВЭЖХ-МС)⁵ [14, 35], а также ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием⁶ [20].

¹ OSHA Technical Manual (OTM) Section II Chapter 2 – Surface Contaminants, Skin Exposure, Biological Monitoring and Other Analyses. Available at: https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_ii/otm_ii_2.html#Wipe_Sampling_BioMonitoring. Accessed: 24.08.2020

² OSHA Technical Manual (OTM) Section II Chapter 2 – Surface Contaminants, Skin Exposure, Biological Monitoring and Other Analyses. Available at: https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_ii/otm_ii_2.html#Wipe_Sampling_BioMonitoring. Accessed: 24.08.2020.

³ Evaluation Guidelines for Surface Sampling Methods. Available at: <https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/surfacesampling/surfacesampling.pdf>. Accessed: 24.08.2020.

⁴ OSHA Technical Manual (OTM) Section II Chapter 1 – Personal Sampling for Air Contaminants. Available at: https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_ii/otm_ii_1.html. Accessed: 24.08.2020.

⁵ OSHA Technical Manual (OTM) Section II Chapter 2 – Surface Contaminants, Skin Exposure, Biological Monitoring and Other Analyses. Available at: https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_ii/otm_ii_2.html#Wipe_Sampling_BioMonitoring. Accessed: 24.08.2020.

⁶ Kennedy E. R., Fischbach T. J., Song R., Eller P. M., Shulman S. A. Guidelines for Air Sampling and Analytical Method Development and Evaluation. Available at: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/95-117/pdfs/95-117.pdf?id=10.26616/NIOSHPUB95117>. Accessed: 24.08.2020.

Расчеты содержания вредных веществ в воздухе рабочей зоны проводят в соответствии с ГОСТом 12.1.016-79.

Концентрацию вредных веществ (C), отобранных из воздуха с концентрированием и переведенных в раствор, вычисляют по следующей формуле:

$$C = \frac{m}{V_a} \cdot \frac{V_{\text{общ.}}}{V_{20}},$$

где m – количество вещества, найденное в анализируемом объеме раствора, мкг; $V_{\text{общ.}}$ – общий объем раствора, см³; V_a – объем раствора, взятого для анализа, см³; V_{20} – объем воздуха, отобранный для анализа, приведенный к нормальным условиям (при температуре 293 К (20 °С) и атмосферном давлении 101,3 кПа (760 мм рт.ст.), л.

Концентрацию вредных веществ (C), отобранных из воздуха без концентрирования, вычисляют по следующей формуле:

$$C = \frac{m}{V_{20}},$$

где m – количество вещества, найденное в анализируемом объеме раствора, мкг; V_{20} – объем воздуха, отобранный для анализа, приведенный к нормальным условиям (при температуре 293 К (20 °С) и атмосферном давлении 101,3 кПа (760 мм рт.ст.), л.

Концентрацию вредных веществ (C), определяемых в смывах с поверхности, вычисляют по следующей формуле:

$$C = \frac{m}{100 \text{ м}^2},$$

где m – количество вещества, найденное в анализируемом объеме раствора, мкг.

При любых измерениях необходимо проводить расчет погрешностей измерения. Суммарная погрешность измерения складывается из суммы неисключенных остатков систематической и случайной погрешностей. В случае измерений концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны неисключенная систематическая погрешность обуславливается погрешностью приготовления растворов, погрешностью приготовления градуировочных смесей вредных веществ с воздухом, погрешностью прибора, погрешностью построения градуировочного графика, погрешностью отбора проб воздуха и погрешностью самого измерения (ГОСТ 12.1.016–79).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный в настоящем обзоре универсальный подход является полезным инструментом в разработке индивидуальных методик организации и проведения гигиенического мониторинга воздуха

рабочей зоны для конкретных веществ. С помощью описанного подхода фармацевтические предприятия смогут не только оценить содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны, а в дальнейшем осуществлять контроль за их допустимым уровнем, но также выявить и устранить недостатки/нарушения в технологическом процессе, обуславливающие возможное повышение концентрации вредных веществ, что позволит скорректировать условия труда, определить необходимость использования персоналом соответствующих СИЗ и другое. Данные мероприятия существенно повысят уровень безопасности на фармацевтических предприятиях и в значительной степени снизят влияние факторов риска на здоровье сотрудников, непосредственно контактирующих с АФС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Heron R. J., Pickering F. C. Health effects of exposure to active pharmaceutical ingredients (APIs). *Occup Med (Lond)*. 2003;53(6):357–362. DOI: 10.1093/occmed/kqg115.
2. Teichman R. F., Fallon L. F., Brandt-Rauf P. W. Health effects on workers in the pharmaceutical industry: a review. *J Soc Occup Med*. 1988;38(3):55–57. DOI: 10.1093/occmed/38.3.55.
3. Raju S., Siddharthan T., McCormack M. C. Indoor Air Pollution and Respiratory Health. *Clin Chest Med*. 2020;41(4):825–843. DOI: 10.1016/j.ccm.2020.08.014.
4. Tiotiu A. I., Novakova P., Nedeva D., Chong-Neto H. J., Novakova S., Steiropoulos P., Kowal K. Impact of Air Pollution on Asthma Outcomes. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(17):6212. DOI: 10.3390/ijerph17176212.
5. Birmili W., Kolossa-Gehring M., Valtanen K., Dębiak M., Salthammer T. Schadstoffe im Innenraum – aktuelle Handlungsfelder. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2018;61(6):656–666. DOI: 10.1007/s00103-018-2737-8.
6. Farmer D. K., Vance M. E. Indoor air: sources, chemistry and health effects. *Environ Sci Process Impacts*. 2019;21(8):1227–1228. DOI: 10.1039/c9em90035g.
7. Guengerich F. P. Mechanisms of drug toxicity and relevance to pharmaceutical development. *Drug Metab Pharmacokin*. 2011;26(1):3–14. DOI: 10.2133/dmpk.dmpk-10-rv-062.
8. Axon M. W., Farris J. P., Mason J. Handling highly potent active pharmaceutical ingredients Equipment containment performance. *Chimica Oggi – Chemistry Today*. 2008;26(2):57–61.
9. Faber M. J., Galati G., Dinyer J. S. Handling of Highly Potent Pharmaceutical Compounds. *Chimica Oggi – Chemistry Today*. 2014;32(3):34–38.
10. Calhoun D. M., Coler A. B., Nieusma J. L. Strategies for preventing occupational exposure to potent compounds. *Toxicol Mech Methods*. 2011;21(2):93–96. DOI: 10.3109/15376516.2010.484621.
11. González-Martín J., Kraakman N. J. R., Pérez C., Lebrero R., Muñoz R. A state-of-the-art review on indoor air pollution and strategies for indoor air pollution control. *Chemosphere*. 2021;262:128376. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.128376.
12. Amoatey P., Omidvarborna H., Baawain M. S., Al-Mamun A. Indoor air pollution and exposure assessment of the gulf cooperation council countries: A critical review. *Environ Int*. 2018;121:491–506. DOI: 10.1016/j.envint.2018.09.043.
13. Саноцкий И. В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия). М.: Медицина; 1970. 342 с.
14. Ragazzi M. Air Quality: Monitoring, Measuring, and Modeling Environmental Hazards. New York: Apple Academic Press; 2016. 306 p.
15. McDermott H. J. Air Monitoring for Toxic Exposures. Hoboken, N. J.: John Wiley & Sons, Inc.; 2004. 688 p.

16. Shockey T. M., Babik K. R., Wurzelbacher S. J., Moore L. L., Bise-si M. S. Occupational exposure monitoring data collection, storage, and use among state-based and private workers' compensation insurers. *J Occup Environ Hyg.* 2018;15(6):502–509. DOI: 10.1080/15459624.2018.1453140.
17. Boss M. J., Day D. W. Air Sampling and Industrial Hygiene Engineering. Boca Raton: CRC Press; 2001. 296 p.
18. Baron P. A. Personal Aerosol Sampler Design: A Review. *Applied Occupational and Environmental Hygiene.* 1998;13(5):313–320. DOI: 10.1080/1047322x.1998.10390088.
19. Mark D., Vincent J. H. A new personal sampler for airborne total dust in workplaces. *Ann Occup Hyg.* 1986;30(1):89–102. DOI: 10.1093/annhyg/30.1.89.
20. Binks S. P. Occupational toxicology and the control of exposure to pharmaceutical agents at work. *Occup Med (Lond).* 2003;53(6):363–370. DOI: 10.1093/occmed/kqg116.
21. Kenny L. C., Aitken R. J., Baldwin P. E. J., Beaumont G. C., Maynard A. D. The Sampling Efficiency of Personal Inhalable Aerosol Samplers in Low Air Movement Environments. *Journal of Aerosol Science.* 1999;30(5):627–638. DOI: 10.1016/s0021-8502(98)00752-6.
22. Harper M. Assessing workplace chemical exposures: the role of exposure monitoring. *J Environ Monit.* 2004;6(5):404–412. DOI: 10.1039/b314697a.
23. Vincent J. H. Aerosol Sampling. Science, Standards, Instrumentation and Applications. John Wiley & Sons, Ltd; 2007. 640 p.
24. Dugheri S., Mucci N., Cappelli G., Bonari A., Garzaro G., Marrubini G., Bartolucci G., Campagna M., Arcangeli G. Monitoring of Air-Dispersed Formaldehyde and Carbonyl Compounds as Vapors and Adsorbed on Particulate Matter by Denuder-Filter Sampling and Gas Chromatographic Analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(11):1969. DOI: 10.3390/ijerph16111969.
25. Jilkova S. R., Melymuk L., Klanova J. Emerging investigator series: air conditioning filters as a sampler for semi-volatile organic compounds in indoor and near-building air. *Environ Sci Process Impacts.* 2020;22(12):2322–2331. DOI: 10.1039/d0em00284d.
26. Soo J. C., Monaghan K., Lee T., Kashon M., Harper M. Air sampling filtration media: Collection efficiency for respirable size-selective sampling. *Aerosol Sci Technol.* 2016;50(1):76–87. DOI: 10.1080/02786826.2015.1128525.
27. Кириллов В. Ф., Бучнев А. А., Чиркин А. В. О средствах индивидуальной защиты органов дыхания работающих (обзор литературы). *Медицина труда и промышленная экология.* 2013;(4):25–31.
28. Anna D. H. Occupational Environment – Its Evaluation, Control, and Management. Fairfax: AIHA Publication; 2011.
29. Connor T. H., Smith J. P. New approaches to wipe sampling methods for antineoplastic and other hazardous drugs in healthcare settings. *Pharm Technol Hosp Pharm.* 2016;1(3):107–114. DOI: 10.1515/ptph-2016-0009
30. Hebisch R., Fricke H. H., Hahn J. U., Lahaniatis M. Sampling and determining aerosols and their chemical components. The MAK-Collection for Occupational Health and Safety, Part III: Air Monitoring Methods. Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2005. 196 p.
31. Sampling and Analysis of Toxic Organics in the Atmosphere: A symposium. Philadelphia: American Society for Testing and Materials; 1980. 192 p.
32. Caplan K. J. The Significance of Wipe Samples. *American Industrial Hygiene Association Journal.* 1993;54(2):70–75. DOI: 10.1080/15298669391354342.
33. Другов Ю. С., Беликов А. Б., Дьякова Г. А., Тульчинский В. М. Методы анализа загрязнений воздуха. М.: Химия; 1984. 384 с.
34. Rajapakse M. Y., Borrás E., Fung A. G., Yeap D., McCartne M. M., Fabia F. M., Kenyon N. J., Davis C. E. An environmental air sampler to evaluate personal exposure to volatile organic compounds. *Analyst.* 2021;146(2):636–645. DOI: 10.1039/d0an01521k.
35. Paul R., Smith S., Gent L., Sutherill R. Air monitoring for synthetic cannabinoids in a UK prison: Application of personal air sampling and fixed sequential sampling with thermal desorption two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 2021;13(9):1678–1685. DOI: 10.1002/dta.3101 34.

REFERENCES

1. Heron R. J., Pickering F. C. Health effects of exposure to active pharmaceutical ingredients (APIs). *Occup Med (Lond).* 2003;53(6):357–362. DOI: 10.1093/occmed/kqg115.
2. Teichman R. F., Fallon L. F., Brandt-Rauf P. W. Health effects on workers in the pharmaceutical industry: a review. *J Soc Occup Med.* 1988;38(3):55–57. DOI: 10.1093/occmed/38.3.55.
3. Raju S., Siddharthan T., McCormack M. C. Indoor Air Pollution and Respiratory Health. *Clin Chest Med.* 2020;41(4):825–843. DOI: 10.1016/j.ccm.2020.08.014.
4. Tiotiu A. I., Novakova P., Nedeva D., Chong-Neto H. J., Novakova S., Steiropoulos P., Kowal K. Impact of Air Pollution on Asthma Outcomes. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(17):6212. DOI: 10.3390/ijerph17176212.
5. Birmili W., Kolossa-Gehring M., Valtanen K., Dębiak M., Salthammer T. Schadstoffe im Innenraum – aktuelle Handlungsfelder. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2018;61(6):656–666. DOI: 10.1007/s00103-018-2737-8.
6. Farmer D. K., Vance M. E. Indoor air: sources, chemistry and health effects. *Environ Sci Process Impacts.* 2019;21(8):1227–1228. DOI: 10.1039/c9em90035g.
7. Guengerich F. P. Mechanisms of drug toxicity and relevance to pharmaceutical development. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2011;26(1):3–14. DOI: 10.2133/dmpk.dmpk-10-rv-062.
8. Axon M. W., Farris J. P., Mason J. Handling highly potent active pharmaceutical ingredients Equipment containment performance. *Chimica Oggi – Chemistry Today.* 2008;26(2):57–61.
9. Faber M. J., Galati G., Dinyer J. S. Handling of Highly Potent Pharmaceutical Compounds. *Chimica Oggi – Chemistry Today.* 2014;32(3):34–38.
10. Calhoun D. M., Coler A. B., Nieusma J. L. Strategies for preventing occupational exposure to potent compounds. *Toxicol Mech Methods.* 2011;21(2):93–96. DOI: 10.3109/15376516.2010.484621.
11. González-Martín J., Kraakman N. J. R., Pérez C., Lebrero R., Muñoz R. A state-of-the-art review on indoor air pollution and strategies for indoor air pollution control. *Chemosphere.* 2021;262:128376. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.128376.
12. Amoatey P., Omidvarborna H., Baawain M. S., Al-Mamun A. Indoor air pollution and exposure assessment of the gulf cooperation council countries: A critical review. *Environ Int.* 2018;121:491–506. DOI: 10.1016/j.envint.2018.09.043.
13. Sanotskiy I. V. *Metody opredeleniya toksichnosti i opasnosti khimicheskikh veshchestv (toksikometriya)* [Methods for determining the toxicity and hazard of chemicals (toxicometry)]. Moscow: Meditsina; 1970. 342 p. (In Russ.)
14. Ragazzi M. Air Quality: Monitoring, Measuring, and Modeling Environmental Hazards. New York: Apple Academic Press; 2016. 306 p.
15. McDermott H. J. Air Monitoring for Toxic Exposures. Hoboken, N. J.: John Wiley & Sons, Inc.; 2004. 688 p.
16. Shockey T. M., Babik K. R., Wurzelbacher S. J., Moore L. L., Bise-si M. S. Occupational exposure monitoring data collection, storage, and use among state-based and private workers' compensation insurers. *J Occup Environ Hyg.* 2018;15(6):502–509. DOI: 10.1080/15459624.2018.1453140.
17. Boss M. J., Day D. W. Air Sampling and Industrial Hygiene Engineering. Boca Raton: CRC Press; 2001. 296 p.
18. Baron P. A. Personal Aerosol Sampler Design: A Review. *Applied Occupational and Environmental Hygiene.* 1998;13(5):313–320. DOI: 10.1080/1047322x.1998.10390088.

19. Mark D., Vincent J.H. A new personal sampler for airborne total dust in workplaces. *Ann Occup Hyg.* 1986;30(1):89–102. DOI: 10.1093/annhyg/30.1.89.
20. Binks S. P. Occupational toxicology and the control of exposure to pharmaceutical agents at work. *Occup Med (Lond).* 2003;53(6):363–370. DOI: 10.1093/occmed/kqg116.
21. Kenny L. C., Aitken R. J., Baldwin P. E. J., Beaumont G. C., Maynard A. D. The Sampling Efficiency of Personal Inhalable Aerosol Samplers in Low Air Movement Environments. *Journal of Aerosol Science.* 1999;30(5):627–638. DOI: 10.1016/S0021-8502(98)00752-6.
22. Harper M. Assessing workplace chemical exposures: the role of exposure monitoring. *J Environ Monit.* 2004;6(5):404–412. DOI: 10.1039/b314697a.
23. Vincent J. H. Aerosol Sampling. Science, Standards, Instrumentation and Applications. John Wiley & Sons, Ltd; 2007. 640 p.
24. Dugheri S., Mucci N., Cappelli G., Bonari A., Garzaro G., Marrubini G., Bartolucci G., Campagna M., Arcangeli G. Monitoring of Air-Dispersed Formaldehyde and Carbonyl Compounds as Vapors and Adsorbed on Particulate Matter by Denuder-Filter Sampling and Gas Chromatographic Analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(11):1969. DOI: 10.3390/ijerph16111969.
25. Jilkova S. R., Melymuk L., Klanova J. Emerging investigator series: air conditioning filters as a sampler for semi-volatile organic compounds in indoor and near-building air. *Environ Sci Process Impacts.* 2020;22(12):2322–2331. DOI: 10.1039/d0em00284d.
26. Soo J. C., Monaghan K., Lee T., Kashon M., Harper M. Air sampling filtration media: Collection efficiency for respirable size-selective sampling. *Aerosol Sci Technol.* 2016;50(1):76–87. DOI: 10.1080/02786826.2015.1128525.
27. Kirillov V. F., Buchnev A. A., Chirkin A. V. On personal respiratory protection equipment for workers (literature review). *Meditina truda i promyshlennaya ekologiya = Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology.* 2013;(4):25–31. (In Russ.)
28. Anna D. H. Occupational Environment – Its Evaluation, Control, and Management. Fairfax: AIHA Publication; 2011.
29. Connor T. H., Smith J. P. New approaches to wipe sampling methods for antineoplastic and other hazardous drugs in healthcare settings. *Pharm Technol Hosp Pharm.* 2016;1(3):107–114. DOI: 10.1515/pthp-2016-0009
30. Hebisch R., Fricke H. H., Hahn J. U., Lahaniatis M. Sampling and determining aerosols and their chemical components. The MAK-Collection for Occupational Health and Safety, Part III: Air Monitoring Methods. Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2005. 196 p.
31. Sampling and Analysis of Toxic Organics in the Atmosphere: A symposium. Philadelphia: American Society for Testing and Materials; 1980. 192 p.
32. Caplan K. J. The Significance of Wipe Samples. *American Industrial Hygiene Association Journal.* 1993;54(2):70–75. DOI: 10.1080/15298669391354342.
33. Drugov Yu. S., Belikov A. B., Dyakova G. A., Tulchinskiy V. M. *Metody analiza zagryazneniy vozdukh* [Methods of air pollution analysis]. Moscow: Khimiya; 1984. 384 p. (In Russ.)
34. Rajapakse M. Y., Borrás E., Fung A. G., Yeap D., McCartne M. M., Fabia F. M., Kenyon N. J., Davis C. E. An environmental air sampler to evaluate personal exposure to volatile organic compounds. *Analyst.* 2021;146(2):636–645. DOI: 10.1039/d0an01521k.
35. Paul R., Smith S., Gent L., Sutherill R. Air monitoring for synthetic cannabinoids in a UK prison: Application of personal air sampling and fixed sequential sampling with thermal desorption two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 2021;13(9):1678–1685. DOI: 10.1002/dta.3101 34.



Ингредиенты и добавки

Международная
конференция
и выставка

**26–28 апреля
2022**

Москва, Технопарк «Сколково»

«Ингредиенты и добавки» — это:

- Масштабная деловая программа с эксклюзивными знаниями из первых рук
- Широкий выбор ингредиентов и добавок для производства товаров повседневного спроса
- Современная выставочная площадка с хорошей транспортной доступностью



Получите бесплатный
электронный билет
по промокоду: **pharmj21**

new.ingred.ru

Организатор



Международная
Выставочная
Компания

+7 (495) 252-11-07
ingred@mvk.ru

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикации в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этического поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля «Разработка и регистрация лекарственных средств» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», должно соответствовать науке:

- 14.04.01 – Технология получения лекарств (фармацевтические науки);
- 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки);
- 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия (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 выборок 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 отдает приоритет аспирантским и докторским работам, 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 несоответствия 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
6. ORCID всех авторов статьи.

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.

Вклад авторов. Авторы должны написать информацию о их вкладе в работу (пример: Авторы X1, X2 и X3 придумали и разработали эксперимент, авторы X4 и X5 синтезировали образцы и провели их электрохимическое исследование. X3 и X4 провели исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ЯМР. Авторы X1 и X6 участвовали в обработке данных. Автор X7 проводил теоретические расчеты. Авторы X1, X2 и X7 участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов).

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).

Contribution of the authors. Вклад авторов на английском языке должен соответствовать русскоязычному.

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.

Должен быть переведен текст в таблицах и в рисунках. Текст должен быть и на русском, и на английском языках.

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 выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов.

При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производителя 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-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: Синдронол 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 необходимо приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9 %, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацевтикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производителя и страну происхождения [пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производителя, 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: 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 вариабельности) 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, написание 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 ал-

фавиту. 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.). Название русскоязычных журналов в REFERENCES дается в *транслитерации*, затем ставится знак = и дается *английское название журнала* (не нужно самостоятельно переводить русское название журнала на английский язык, можно указать лишь ту версию названия на английском языке, которая, как правило, имеется на англоязычном сайте этого журнала. Если же ее нет, можно ограничиться транслитерацией).

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. Литература

Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб.: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева; 2015. 272 с.

References

Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznanov N. G. *Vvedenie v psikhofarmakogenetiku* [Introduction to psychopharmacogenetics]. St. Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva; 2015. 272 p. (In Russ.).

2. Литература

Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013;15(1):20–23

References

Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer. *Onkologiya*. 2013;15(1):20–23. (In Russ.).

3. Литература

Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117 DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

References

Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

4. Литература/References

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.

5. Литература/References

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. Недопустимо 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

Литература

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис; 2009. 328 с.

References

Sokolova G. N., Potapova V. B. *Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka* [Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis; 2009:328 p. (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 p.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название статьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

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.

References

Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskulyarnaya terapiya 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 подписью на русском и английском языках. В 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 подписей рисунков 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.

Комплексные доклинические исследования лекарственных препаратов позволяют получить данные о безопасности, качестве и эффективности лекарственных средств:

- изучение общетоксических свойств (острая и хроническая токсичность)
- оценка местнораздражающего действия
- специфические виды токсичности (мутagenность, репродуктивная токсичность, алергизирующее и иммунотоксическое действие)
- специфическая фармакологическая активность
- фармакокинетические исследования

МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВСЕЙ ФАРМЫ

WWW.OLPHARM.RU

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

ТЕСТИРОВАНИЕ РАСТВОРЕНИЯ

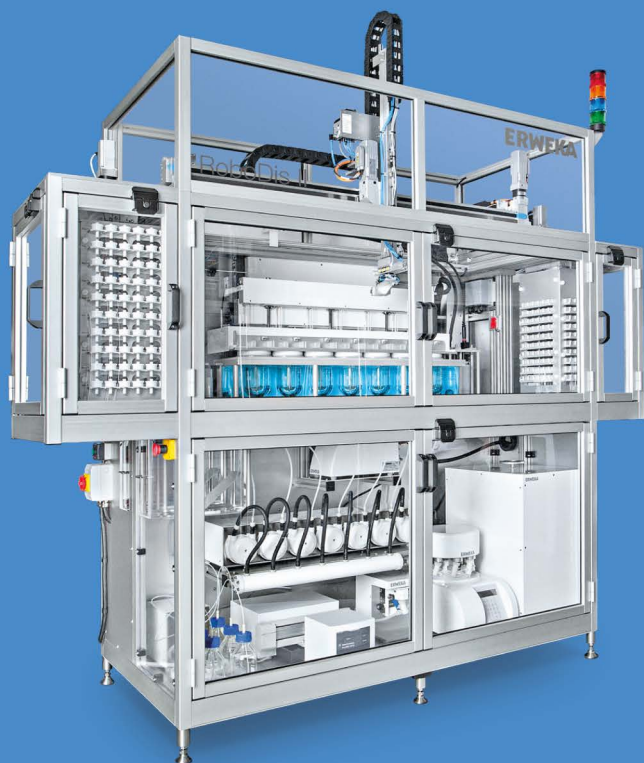
DT 950 Series

ЦИФРОВОЕ
ТЕСТИРОВАНИЕ
РАСТВОРЕНИЯ



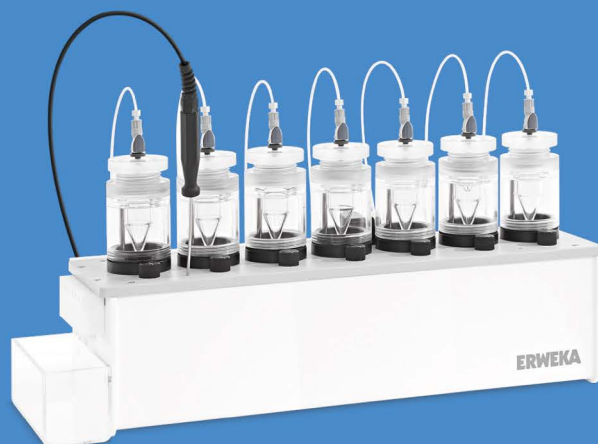
RoboDis II+

ПОЛНОСТЬЮ
АВТОМАТИЧЕСКОЕ
ТЕСТИРОВАНИЕ



USP 4 DFZ II

ТЕСТИРОВАНИЕ ПО МЕТОДУ
ПРОТОЧНАЯ ЯЧЕЙКА



ООО „ЭРВЕКА“

115114 Москва
Летниковская 16-103

E-Mail: sales@erweka.ru
Тел.: +7 499 110 90 60

ERWEKA