

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ

ВАК Scopus®



Ежегодная конференция

«Разработка и регистрация биотехнологических лекарственных средств»

ЦФА | центр
фармацевтической
аналитики

Конференция состоится **17 июня 2022 года** в живом формате

Для посещения мероприятия необходимо заполнить форму регистрации
Подробнее см. 10 стр.



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, № 2

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2022. Volume 11, No. 2

Цели и задачи журнала

Научно-производственный рецензируемый журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» – актуальное бесплатное ежеквартальное прикладное издание и информационный портал для специалистов, задействованных в сфере обращения лекарственных средств. Журнал предназначен для фармацевтических предприятий-производителей и их сотрудников из отделов разработки, контроля качества, регистрации, производства и развития; сотрудников лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений. Основная цель журнала – обобщение научных и практических достижений в сфере разработки и регистрации лекарственных средств, повышение научной и практической квалификации специалистов сферы обращения лекарственных средств. Основные **пять тематических разделов** журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» включают цикл развития лекарственного средства от его создания до получения регистрационного 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, Рединг, 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., д. 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

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

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

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

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

Джупарова И. А., доцент, д. фарм. н., заведующий кафедрой управления и экономики фармации, медицинского и фармацевтического товароведения ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», Новосибирск, 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

Каракулова Е. В., д. фарм. н., профессор кафедры управления и экономики фармации ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

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

Лаврентьева Л. И., доцент, д. фарм. н., заведующий кафедрой управления и экономики фармации ФГБОУ ВО Ярославский государственный медицинский университет Минздрава России, Ярославль, Россия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Irina A. Dzhuparova, as. Dr. of Sci., Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, 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

Elena V. Karakulova, Dr. of Sci., Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

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

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

Larisa I. Lavrenteva, as. Dr. of Sci., Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, 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
Мероприятия	33
 Поиск и разработка новых лекарственных средств	
Зависимость антимикробных эффектов гуанидинсодержащих производных пектина от некоторых структурных характеристик О. Р. Ахмедов, Ш. А. Шомуротов, А. С. Тураев, А. В. Сидоренко	38
Определение активности экспериментального противохолерного иммуноэнтросорбента <i>in vitro</i> в дот-иммуноанализе М. В. Овчинникова, Е. Г. Абрамова, М. Н. Киреев, Т. Ю. Кириллова, Н. А. Шарапова, В. В. Рогожин	46
Фармакотехнологические исследования биомассы <i>Chlorella vulgaris</i> C-2019 как перспективного источника получения антибактериальных веществ А. В. Митишев, Е. Е. Курдюков, Е. Ф. Семенова, Т. М. Фадеева, И. Я. Моисеева, Я. П. Моисеев	53
Иммунотропное влияние водорастворимых полисахаридов растений рода <i>Saussurea</i> на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов мышей А. А. Лигачёва, Е. И. Гулина, Ю. В. Шабанова, Е. С. Трофимова, С. В. Кривошеков, Н. В. Гуркин, М. Н. Шурупов, Е. Ю. Шерстобоев, М. Г. Данилец, М. В. Белоусов	59
Противомикробная активность соединений полифенольной природы В. Г. Лужанин, А. К. Уэйли, А. О. Понкратова, В. В. Новикова, Е. А. Безверхняя	65
 Фармацевтическая технология	
Разработка и изучение ушных капель с бактериофагами для лечения инфекционных отитов, осложненных <i>P. aeruginosa</i> Е. О. Бахрушина, М. Н. Анурова, С. С. Бочкарева, А. М. Воробьев, Ю. О. Щербина, М. А. Пасивкина, Л. О. Крехтунова, Н. Б. Демина, А. В. Алешкин	74
Проточное диспергирование для получения микрочастиц поликапролактона с инкапсулированным ивермектином О. И. Рыбченко, В. В. Суслов, С. А. Кедик, Ю. М. Домнина, А. И. Могайбо	79
Изучение влияния полимеров фармацевтического качества на растворение практически нерастворимых субстанций антиретровирусного действия С. А. Золотов, Н. Б. Демина, Е. С. Пономарев, И. А. Даин, А. С. Золотова	87
Фармацевтико-технологическое исследование адсорбированного жидкого растительного экстракта антимикробного действия А. С. Гуленков, П. Г. Мизина, Е. О. Бахрушина, А. И. Бардаков, А. В. Нюдочкин	94
Исследование влияния способа получения комплексов включения грамицидина С и β-циклодекстрина на их технологические показатели А. А. Дранников, И. С. Ватлин, М. Е. Трусова, А. Ди Мартино, С. В. Кривошеков, А. М. Гурьев, М. В. Белоусов	102
Разработка таблеток 4,4'-(пропандиамидо)добензоата натрия, покрытых кишечнорастворимой оболочкой Ю. М. Коцур, Е. В. Флисюк, И. А. Наркевич	109
Разработка состава и технологии комбинированного лекарственного средства на основе микросфер с доксорубицина гидрохлоридом и коеновой кислоты Т. А. Биткина, А. В. Басевич	118
Разработка таблеток для приема внутрь на основе дигидрокверцетина и оценка их общетоксического действия С. А. Абдулраззак, А. Н. Воробьев, Н. И. Сеницына, И. В. Шарутин, О. В. Меньшова, Е. В. Елизарова, Ю. В. Иванов, А. С. Карамян, Р. А. Абрамович, О. Г. Потанина, К. М. Саканян	126

Методы анализа лекарственных средств

Особенности накопления эфирного масла в траве полыни горькой флоры Воронежской области Н. А. Дьякова, А. И. Сливкин, И. М. Коренская	140
--	-----

Выбор оптимальных условий разделения куркуминоидов методом высокоэффективного капиллярного электрофореза (НРСЕ) с применением мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЕКС) Д. И. Писарев, О. О. Новиков, К. С. Никитин, Н. Н. Бойко, К. М. Саканян, М. Ю. Новикова	145
--	-----

Гигиенический мониторинг загрязненности воздуха рабочей зоны твердыми частицами тикагрелора на фармацевтическом предприятии И. А. Пожарнов, А. С. Симаков, Н. А. Шульга, А. Ю. Савченко, О. И. Передеряев, Л. С. Сынова, Ю. В. Медведев, Е. Н. Фишер	153
--	-----

Разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в препаратах аллергенов методом ГЖХ Р. А. Бубенчиков, Е. И. Саканян, Н. В. Зубкова, В. П. Добрынин, С. В. Горяинов, Ф. Хажжар, Е. А. Платонов, Д. И. Писарев, Р. А. Абрамович	159
---	-----

Доклинические и клинические исследования

Модуляция активности <i>rage</i> и CD147 при церебральной амилоидной ангиопатии <i>in vitro</i> А. И. Мосягина, Е. Б. Бойцова, Е. Д. Хилажева, Е. А. Тепляшина, А. В. Моргун, А. Б. Салмина	169
---	-----

Изучение роли гепарина в регуляции морфофункциональных свойств МСК <i>in vitro</i> И. К. Норкин, К. А. Юрова, О. Г. Хазиахматова, Е. С. Мелашенко, В. В. Малашенко, Е. О. Шункин, А. Н. Байков, И. А. Хлусов, Л. С. Литвинова	174
---	-----

Изучение фармакокинетики препарата «КОВИД-глобулин» (специфический иммуноглобулин человека против COVID-19) (АО «Нацимбио», Россия) в рамках фазы I клинического исследования Т. И. Смолянова, Н. С. Багаева, М. А. Колганова, И. Е. Шохин, А. М. Николаева, Т. В. Вязникова, А. А. Панкратова, Е. А. Быкова	180
--	-----

Разработка и валидация методики определения деферирикса в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ П. А. Карпова, Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева, А. В. Суворова, Н. С. Багаева, П. К. Карнакова, И. Е. Шохин	187
--	-----

Разработка и валидация методики определения инновационного препарата DD217 – ингибитора фактора Ха в плазме крови крыс с целью проведения фармакокинетического исследования Н. С. Дубовик, Д. Ф. Гуранда, Г. В. Раменская, Д. Г. Товбин, Д. Н. Тарасов, А. Ю. Савченко, В. С. Арнаутков	197
---	-----

Юбилеи	207
---------------------	-----

CONTENTS

Introduction	10
Events	33
Research and development of new drug products	
Dependence of Antimicrobial Effects of Guanidine-containing Pectin Derivatives from Some Structural Characteristics Oliy R. Akhmedov, Shavkat A. Shomurotov, Abbaskhan S. Turaev, Anastasiya V. Sidarenka	38
Determination of the Activity of an Experimental Anti-choleric Immunoenterosorbent in Vitro in Dot-immunoanalysis Maria V. Ovchinnikova, Elena G. Abramova, Michail N. Kireev, Tatiana Yu. Kirillova, Natalia A. Sharapova, Vadim V. Rogozhin	46
Pharmacotechnological Studies of the Biomass of <i>Chlorella vulgaris</i> C-2019 as a Promising Source of Antibacterial Substances Alexander V. Mitishev, Evgeniy E. Kurdyukov, Elena F. Semenova, Tatyana M. Fadeeva, Inessa Ya. Moiseeva, Yakov P. Moiseev	53
Immunomodulatory Effects of Water-soluble Polysaccharides from Plants of the <i>Saussurea</i> DC Genus on Murine Peritoneal Macrophages Anastasia A. Ligacheva, Ekaterina I. Gulina, Iuliia V. Shabanova, Evgenia S. Trofimova, Sergey. V. Krivoshchekov, Nikita. V. Gurkin, Margarita N. Shurupova, Evgenii Yu. Sherstoboev, Marina G. Danilets, Mikhail V. Belousov	59
Antimicrobial Activity of Polyphenolic Compounds Vladimir G. Luzhanin, Andrei K. Whaley, Anastasiia O. Ponkratova, Valentina V. Novikova, Ekaterina A. Bezverkhniaia	65
Pharmaceutical Technology	
Development and Study of Bacteriophage-containing Dosage Form for the Treatment of the Outer Ear Infections Elena O. Bakhrushina, Maria N. Anurova, Svatlana S. Bochkareva, Alexey M. Vorobev, Yulia O. Shcherbina, Maria A. Pasivkina, Lika O. Krekhtunova, Natalia B. Demina, Andrey V. Aleshkin	74
Flow Dispersion for Obtaining Ivermectin Encapsulated in Polycaprolactone Microparticles Oxana I. Rybchenko, Vasily V. Suslov, Stanislav A. Kedik, Yulia M. Domnina, Anastasiya I. Mogaibo	79
Study of the Pharmaceutical Grade Polymers effect on the Dissolution of Practically Insoluble Antiretroviral Substances Sergey A. Zolotov, Natalia B. Demina, Evgenii S. Ponomarev, Igor A. Dain, Anna S. Zolotova	87
Pharmaceutical-technological Study of Adsorbed Liquid Plant Extract of Antimicrobial Activity Alexander S. Gulenkov, Praskovya G. Mizina, Elena O. Bakhrushina, Alexander I. Bardakov, Arseniy V. Nyudochkin	94
Investigation of the Influence of Formulation Method on Technological Parameters of Gramicidin S and β-cyclodextrin Inclusion Complexes Aleksandr A. Drannikov, Ivan S. Vatlin, Marina E. Trusova, Antonio Di Martino, Sergei V. Krivoshchekov, Artem M. Guriev, Mikhail V. Belousov	102
Development of Enteric-coated Tablets of Sodium 4,4'-(propanidiamido)dibenzoate Julia M. Kotsur, Elena V. Flisyuk, Igor A. Narceyevich	109
Development of the Composition and Technology of a Combined Drug Based on Microspheres with Doxorubicin Hydrochloride and Comenic Acid Tatyana A. Bitkina, Anna V. Basevich	118
Development of Dihydroquercetin-based Oral tablets and Evalution of the General Toxic Effect Sayed A. Abdulrazzak, Alexander N. Vorobyev, Nina I. Sinitsyna, Igor V. Sharutin, Olga V. Menshova, Ekaterina V. Elizarova, Yuriy V. Ivanov, Arfenya S. Karamyan, Rimma A. Abramovich, Olga G. Potanina, Karen M. Sakanyan	126

Analytical Methods

Features of Accumulation of Essential Oil in Bitter Wormwood Herbs of Flora of Voronezh Region of Russia

Nina A. Dyakova, Alexey I. Slivkin, Irina M. Korenskaya 140

Selection of Optimal Conditions for the Separation of Curcuminoids by High-performance Capillary Electrophoresis (HPCE) Using Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC)

Dmitry I. Pisarev, Oleg O. Novikov, Kirill S. Nikitin, Nikolay N. Boyko, Karen M. Sakanyan, Marina Yu. Novikova 145

Hygienic Monitoring of Working Area Air Pollution by Particulate Matter of ticagrelator in the Pharmaceutical Factory

Igor A. Pozharnov, Alexey S. Simakov, Nikolay A. Shulga, Alla Yu. Savchenko, Oleg I. Perederyaev, Lydia S. Synkova, Yuriy V. Medvedev, Elizaveta N. Fisher 153

Development and Validation of a Procedure for the Quantitative Determination of Residual Organic Solvents in Allergen Preparations by GC

Roman A. Bubenchikov, Elena I. Sakanyan, Nataliya V. Zubkova, Valerii P. Dobrynin, Sergey V. Goriainov, Fadi Hajjar, Evgeniy A. Platonov, Dmitry I. Pisarev, Rimma A. Abramovich 159

Preclinical and clinical study

Modulation of Rage and CD147 in Cerebral Amyloid Angiopathy *in vitro*

Angelina I. Mosiagina, Elizaveta B. Boytsova, Elena D. Khilazheva, Elena A. Teplyashina, Andrey V. Morgun, Alla B. Salmina 169

Study of the role of heparin in regulation of the morphofunctional properties of MSC *in vitro*

Igor K. Norkin, Kristina A. Yurova, Olga G. Khaziakhmatova, Elena S. Melashchenko, Vladimir V. Malashchenko, Egor O. Shunkin, Aleksander N. Baikov, Igor A. Khlusov, Larisa S. Litvinova 174

Phase I pharmacokinetics study of drug «COVID-globulin» (specific human immunoglobulin against COVID-19)

Tatyana I. Smolyanova, Natalia S. Bagaeva, Maria A. Kolganova, Igor E. Shohin, Alevtina M. Nikolaeva, Tatyana V. Vyaznikova, Anastasiya A. Pankratova, Ekaterina A. Bykova 180

Development and Validation of a Method for Determining Deferasirox in Human Blood Plasma by HPLC-UV

Polina A. Karpova, Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Dana S. Shchelgacheva, Alexandra V. Suvorova, Natalia S. Bagaeva, Polina K. Karnakova, Igor E. Shohin 187

Development and Validation of the HPLC Method for Quantification of the Innovative Drug DD217, Factor Xa Inhibitor, in Rat Plasma for a Pharmacokinetic Study

Natalia S. Dubovik, Dorel F. Guranda, Galina V. Ramenskaya, Dmitry G. Tovbin, Dmitry N. Tarasov, Alla Yu. Savchenko, Vladimir S. Arnautov 197

Anniversaries 207

Редакционная статья / Editorial article

Ежегодная конференция «Разработка и регистрация биотехнологических лекарственных средств» состоится 17 июня в Москве

В рамках мероприятия мы поговорим о жизненном цикле биотехнологических лекарственных средств, обсудим отдельные аспекты их разработки, исследований и производства.

Annual Conference "Development and Registration of Biotechnological Drugs" will be Held on June 17 in Moscow

We will talk about biotechnological drugs' life cycle, certain aspects of biotechnological drugs' development, research and production.



В рамках мероприятия мы поговорим о жизненном цикле биотехнологических лекарственных средств, обсудим отдельные аспекты разработки, исследований и производства различных групп биотехнологических лекарственных средств, таких как моноклональные антитела, низкомолекулярные гепарины, инсулины, пептидные препараты и другие.

Когда: 17 июня 2022.

Где: г. Москва (точное место проведения будет известно позднее).

Формат: очное участие.

Стоимость: бесплатно.

Для участия в мероприятии необходимо заполнить форму регистрации:



Лекторами конференции выступают представители академической общественности, фармацевтических предприятий, а также регуляторных органов.

Аудитория: сотрудники отделов разработки ЛС фармпредприятий; сотрудники отделов регистрации фармацевтических компаний; сотрудники контрактно-исследовательских организаций; сотрудники научных и образовательных учреждений.

В программе конференции:

1. Общие требования к исследованию биопрепаратов – комментарии к Решению № 89 ЕЭК.
 2. Особенности проведения преаналитического этапа исследований биопрепаратов.
 3. Опыт и особенности проведения исследования фармакокинетики и иммуногенности инновационного препарата – моноклонального антитела.
 4. Опыт и особенности проведения исследования фармакокинетики биопрепаратов для лечения новой коронавирусной инфекции.
 5. Опыт и особенности проведения определения нейтрализующей активности антилекарственных антител клеточным и не клеточным методом.
 6. Опыт и особенности проведения доклинических и клинических исследований препаратов низкомолекулярных и нефракционированных гепаринов.
 7. Опыт и особенности проведения доклинических и клинических исследований препаратов инсулина человека и их аналогов.
 8. Статистические методы в исследованиях фармакокинетики и иммуногенности биотехнологических препаратов.
- Многие другие темы.

УДК 615.11

Редакционная статья / Editorial article

Возрождение химической промышленности России в советский период (1917–1927 гг.). Часть 2

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

Во второй части статьи приведены материалы по дальнейшему структурированию отечественной промышленности и образованию трестов, разработке классификации химических производств и организации научно-технологического отдела ВСНХ (НТО). Показано особое отношение руководства страны к старым кадрам и организациям, обеспечивающим работу предприятий этой отрасли, а также заботу правительства о воспитании молодых отечественных химиков, выращенных в России. Особое место занимает работа по организации привлечения бывших владельцев заводов и фабрик к восстановлению их предприятий. По инициативе В. Н. Ипатьева была начата работа по организации концессионной комиссии при Госплане.

Revival of the Russian chemical industry during the Soviet period (1917–1927). Part 2

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

The second part of the article contains materials on the further structuring of the domestic industry and the formation of trusts, the development of a classification of chemical industries and the organization of the Scientific and Technological Department of the Supreme Economic Council (NTO). The special attitude of the country's leadership towards the old personnel and organizations that ensure the operation of enterprises in this industry, as well as the government's concern for the education of young domestic chemists grown in Russia, is shown. A special place is occupied by the work on organizing the involvement of former owners of plants and factories in the restoration of their enterprises. On the initiative of VN Ipatiev, work began on the organization of a concession commission under the State Planning Committee.

The second part contains materials on the further structuring of the domestic industry and the formation of trusts, the development of a classification of chemical industries and the organization of the Scientific and Technological Department of the Supreme Economic Council (NTO). The special attitude of the country's leadership towards the old personnel and organizations that ensure the operation of enterprises in this industry, as well as the government's concern for the education of young domestic chemists grown in Russia, is shown. A special place is occupied by the work on organizing the involvement of former owners of plants and factories in the restoration of their enterprises. On the initiative of VN Ipatiev, work began on the organization of a concession commission under the State Planning Committee.

Начиная с 1918 г., как уже было сказано выше, вся крупная промышленность была подчинена ВСНХ и разделена на объединения по отраслям, которые возглавлялись Главками. Их было много: Главжир, Главрыба, Главщетина, Главкожа, Главлес, Главкрахмал, Главспирт, Главспички, Главметалл, Главнефть, Главсахар, Главвоенпром и пр. Среди них был и Главхим. Опыт работы главков показал их излишнюю раздробленность, неповоротливость и плохую управляемость, что не способствовало развитию и укреплению хозяйственной власти государства на рынке. Поэтому в августе 1921 г. в Москве состоялись президиумы Совета труда и обороны, где были утверждены «Основные положения о мерах к восстановлению крупной промышленности и поднятию и развитию производства», также был поднят вопрос о преобразовании этих

органов (Приложение IX). Советское правительство обратилось к выдающимся инженерам и ученым страны с поручением наметить необходимые меры для восстановления разрушенной промышленности и выработать план ее дальнейшего развития. Прежде всего, решено было преобразовать главки, заменив их трестами по отраслям.

Такие тресты представляли собой объединения нескольких однородных по производству фабрик, заводов или других предприятий, связанных районом или производственными отношениями. Возможны были объединения в тресты предприятий разных отраслей промышленности (изготовление сырья, полуфабрикатов или запасных частей, являющихся сырьем для других предприятий). В июле 1923 г. Совнарком опубликовал декрет «О государственных

промышленных предприятиях, действующих на началах коммерческого расчета (трестах), находящихся в управлении местных органов» (Приложение X), а в ноябре того же года – постановление «О порядке управления промышленными предприятиями, имеющими общесоюзное значение и находящимися в ведении ВСНХ» (Приложение XI). В последнем документе был приведен список предприятий, имеющих общесоюзное значение, в частности как тресты, относящиеся к химической промышленности, были причислены Резинотрест, Бондюжное объединение, Анилинтрест, Фармтрест, Коксобензолтрест, Лакокраскатрест, Ацетометилтрест, Сантонинный завод. Так было организовано Главное управление химической промышленности.

Следующий шаг заключался в создании классификации химических производств и организации научно-технологического отдела ВСНХ (НТО).

Не забывало правительство и о кадрах, способных организовать отечественную промышленность и передать свой опыт, обучить производственников. Иллюстрацией такого рачительного отношения к дореволюционным специалистам на начальном этапе восстановления промышленности служит постановление Народного комиссара труда о кадрах, обладающих знаниями и опытом, – «Об использовании знаний и опыта высшего технического, коммерческого, ученого и врачебного персонала в свободное от занятий время (Приложение XII). Но советское государство нуждалось также и в молодых, выращенных в России, кадрах. Об этом свидетельствуют, например, названия таких постановлений Народного комиссариата просвещения, как:

- ✓ О преобразовании петроградских высших учебных заведений (август 1919 г.).
- ✓ Об объединении московских высших учебных заведений (август 1919 г.).
- ✓ Об организации рабочих факультетов при университетах (сентябрь 1919 г.).
- ✓ Положение о научных работниках высших учебных заведений (октябрь 1920 г.).

В начале 1921 г. В. Н. Ипатьев был вызван в Москву в Главное химическое управление (Главхим), где ему было предложено встать во главе коллегии этой организации; причем Центральный комитет профсоюзной организации сотрудников химической промышленности поддержал его кандидатуру. В результате В. Н. Ипатьев возглавил развитие химической промышленности СССР. В конце мая 1921 г. он получил официальный мандат за подписью В. И. Ленина о том, что постановлением ВЦИК он назначен членом президиума ВСНХ и председателем Главхима, то есть по факту он стал членом правительства СССР. Главхим, в свою очередь, был разделен на Главтоп, Главэлектро, военно-технический отдел, финансовую и

экономическую части, Главное управление пищевой промышленности (табак, спирт, сахар и т. п.).

На основании своего опыта В. Н. Ипатьев предложил следующую структуру Главного управления по химической промышленности: во главе управления должен был стоять ответственный руководитель, имеющий двух заместителей: по технической части (специалист) и по административной части (партийный коммунист). Для обсуждения вопросов был учрежден Технический совет, в который входили заведующие отделами управления и приглашенные консультанты. В Главхиме были организованы отделы по различным отраслям химической промышленности: краскам, жирам, коксобензойной промышленности и т. д.

Кроме административной реформы химической промышленности в Москве велось строительство химического института (названного впоследствии в честь Л. Я. Карпова).

С 1921 г. в различных регионах страны стали образовываться районные Госпланы. Они должны были планировать местную промышленность и вносить свои предложения по развитию общегосударственной промышленности в Госплан СССР.

Кардинальный поворот в развитии российской промышленности, в том числе и химической, произошел после предоставления в президиум ВСНХ и Госплан специальной записки, автором которой был В. Н. Ипатьев. В ней автор предлагал вместо закупки за золото за рубежом новых технологий и машин привлечь к развитию сохранившихся на территории России производств иностранным капиталом, то есть попробовать вовлечь в дело восстановления промышленности бывших владельцев заводов и фабрик. Однако так как в стране была ликвидирована частная собственность и соответственно национализированы промышленные предприятия, вернуть их полностью прежним хозяевам возможным не представлялось. По этой причине В. Н. Ипатьев предложил отдать такие предприятия бывшим зарубежным владельцам в арендное долгосрочное пользование с тем, чтобы они за свой счет и, используя кредиты иностранных банков, смогли не только в кратчайший срок привести их в полный порядок, но и ввести в их работу новейшие технологии и усовершенствования, отвечающие последним требованиям науки и техники. Для переговоров с бывшими хозяевами этих производств В. Н. Ипатьев рекомендовал отправить за границу компетентного человека, который не только бы пользовался особым доверием владельцев, но и имел бы право и полномочия вести подобные переговоры. Эта записка вызвала живейший интерес. Для принятия решения было созвано открытое заседание президиумов ВСНХ и Госплана. На заседании присутствовали многие специалисты химической, металлургической и других отраслей промышленности.

В своем выступлении В. Н. Ипатьев предложил себя на роль переговорщика, обосновав это тем, что он хорошо знаком с большинством бывших владельцев химических предприятий. Но это его предложение было встречено с недоверием. Некоторые участники заседания усмотрели в этом обычное желание съездить за границу с личными целями. Поэтому В. Н. Ипатьеву пришлось дать некоторые пояснения. Он сказал: «Поездка за границу в данных обстоятельствах не обещает быть приятной, так как придется испрашивать милостивого разрешения для свидания и беседы у каждого владельца заводов, а может быть и получать отказы. Скорее всего, придется униженно ожидать ответа в передней. Я охотно могу отказать от этой тяжелой для меня поездки, и пусть исполнение этой деликатной и трудной задачи будет возложено на другое лицо». Скорее всего, именно это обстоятельство убедило собрание в правильности сделанного предложения. Результаты этого заседания были доложены правительству, и оно приняло решение командировать за границу В. Н. Ипатьева, чтобы он начал переговоры по взаимодействию с бывшими хозяевами предприятий.

В конце 1920 г. В. Н. Ипатьев перед президиумом ВСНХ поднял еще один важный вопрос, а именно – о приведении в порядок коксобензольной промышленности. Большинство заводов по выработке бензола и других углеводородов за время революции и гражданской войны претерпели большие разрушения и требовали ремонта. Строительство ряда заводов было заморожено. Большая часть этих предприятий находилась в Донецком бассейне. Он настоял, чтобы этот вопрос был отдельно рассмотрен на президиуме ВСНХ с привлечением местных специалистов. Владимир Николаевич по своему опыту знал, что коксобензольная отрасль является главной составной частью оборонной промышленности, и ее спасение означает внесение огромного вклада в оборону СССР. К решению этого вопроса был привлечен Ю. Л. Пятаков – председатель Центрального правления каменноугольной промышленности Донбасса, начальник Главного управления по топливу и заместитель председателя Госплана и ВСНХ.

Восстановление разрушенных заводов представляло собой огромную проблему, требующую обязательного и скорого решения. Однако не меньшая задача стояла перед правительством и в отношении строительства новых предприятий. В. Н. Ипатьев в своей монографии приводит один пример оперативного решения такой проблемы с привлечением руководителей самого высокого уровня. Осенью 1921 г. к В. Н. Ипатьеву приехал коммунист из Кузнецкого бассейна Сибири и привез образцы соды, полученные из «Петуховских» соляных озер. Приезжий рассказал, что эти озера богаты содой, причем осенью, когда они пересыхают, добывание соды превращается

в простой ее сбор по берегам множества озер. Сода наряду с серной, соляной и азотной кислотами является чрезвычайно важным компонентом промышленного химического синтеза, поэтому ее получение всегда было актуально. В. Н. Ипатьев провел анализ образцов и установил, что эта сода отличается особой чистотой, т. к. не содержит в себе сернокислых примесей. По результатам проделанной работы он сделал доклад на президиуме ВСНХ, в котором рекомендовал построить рядом с этими соляными озерами простой завод по добыче соды. Члены президиума ВСНХ единогласно согласились с данной рекомендацией, но для получения средств на строительство завода нужно было заручиться постановлением Совета народных комиссаров. Для решения этого вопроса В. И. Ипатьеву пришлось лично встретиться с В. И. Лениным. Это была первая, но не последняя встреча ученого с руководителем правительства. После того как В. Н. Ипатьев и его спутник сделали подробное сообщение, В. И. Ленин согласился помочь и довольно быстро переправил подготовленные документы в Совнарком. В результате решение о выделении необходимых средств на строительство содового завода было получено. В эту же встречу В. И. Ленин попросил В. Н. Ипатьева взглянуть к нему перед отъездом за границу для получения некоторых директив.

С В. И. Лениным В. Н. Ипатьев встречался три раза и всегда отмечал глубокое понимание председателем Совнаркома проблем, связанных с восстановлением отечественной химической промышленности. Вот один такой пример: В. И. Ленин был знаком с материалами о получении спирта из фагнуса (верхнего слоя торфяников). Способ был разработан профессором Мозером и В. П. Кравцом. Авторы предлагали обрабатывать фагнус кислотами. В результате образовывалась галактоза, которая при брожении превращалась в спирт. Разработчики утверждали, что этот способ обеспечивает хороший выход конечного продукта и позволяет сохранять картофель – основное сырье для получения этилового спирта. В. И. Ленин, выслушав доклад ученых, наложил резолюцию: «впредь картофель употреблять только для продовольствия, а добывание спирта установить по новому способу». Через некоторое время В. И. Ленин пригласил В. Н. Ипатьева и попросил его дать свое заключение. Владимир Николаевич проверил результаты, приведенные в докладе, и убедился, что они не отвечают действительности (была неверно указана цена картофеля и не учтен тот момент, что брожение галактозы не всегда протекает гладко). Он за несколько минут объяснил Ленину, что ввиду недостаточности опытов и неверного подсчета материального баланса было бы преждевременно внедрять получение спирта по новому способу в промышленном масштабе. Приведенные доводы были настолько убедитель-

ны, что В. И. Ленин без обид, амбиций и проволочек дал распоряжение не приводить свою резолюцию в исполнение.

Последний раз В. Н. Ипатьев виделся с В. И. Лениным перед поездкой за границу. Выслушав подробный доклад ученого с указанием цели поездки, В. И. Ленин сказал: «Посылая Вас за границу с таким ответственным и деликатным поручением, советская власть вполне доверяет Вам и дает *carte blanche* принимать кого угодно и вести с ними разговоры на разные темы, соблюдая надлежащий такт. Во всех затруднительных случаях обращайтесь лично ко мне, и если нужно, даже по телеграфу». Дополнительно было высказано пожелание, чтобы В. Н. Ипатьев писал ему свои отчеты по возникающим проблемам и результатам переговоров.

С осени 1920 г. в Главхиме шла большая работа по созданию трестов в промышленности. Вместо бывших главков, как было сказано выше, учреждались тресты, объединявшие по несколько находящихся недалеко друг от друга заводов, которыми было бы значительно проще управлять, а также снабжать их сырьем. Необходимо было создать правления этих трестов, выбрать председателей и членов правления, урегулировать всю финансовую сторону. К осени 1921 г. организация трестов была, в основном, закончена. По некоторым данным, к 1923 г. важнейшие отрасли промышленности РСФСР насчитывали около 450 трестов, причем в химической промышленности было создано 35 трестов, объединявших 291 предприятие, на которых работало 45,7 тыс. рабочих. Трестам было предоставлено гораздо больше прав, чем бывшим главкам, в особенности в отношении финансовых дел, т. к. они должны были работать на хозрасчете. Объединение промышленности в тресты укрепило государственную промышленность, придало ей устойчивость и способствовало росту производительности.

Опыт работы трестов выявил также и их слабые места. Распределение промышленности на множество мелких трестов привело к увеличению в стоимости товара, процента накладных расходов и усложнило составление бухгалтерской отчетности из-за отсутствия расчета себестоимости и калькуляции в целом. Оптимальным выходом из создавшегося положения представлялся пересмотр структуры трестов – их уплотнение, укрупнение и образование трестов центральных и губернских. В результате проведенной реорганизации в химической промышленности были сформированы 16 трестов центрального подчинения и 23 треста губернского подчинения¹.

С введением НЭПа возник вопрос об организации правильного функционирования Государственного народного банка, который должен был кредитовать промышленность. Для этой цели был приглашен

старый и опытный финансист Н. Н. Кутлер, а директором банка был назначен коммунист А. Л. Шейнман, который разбирался в банковской деятельности. В результате финансовая составляющая новых организованных структур значительно упростилась и стала мобильнее.

В 1920 г. была предпринята попытка международного взаимодействия по восстановлению химической промышленности России. Один такой опыт описан в монографии В. Н. Ипатьева. Он касается возможности приглашения на работу зарубежных специалистов. В. И. Ленин, после разговоров с американским писателем Дж. Ридом, внес в ВСНХ предложение о приглашении трехсот американских специалистов для работы на предприятиях Кузнецкого бассейна. Печи, предназначенные для получения кокса и добычи из печных газов аммиака, бензола, толуола, нафталина и др. углеводородов, были построены во время Первой мировой войны, но в Гражданскую войну они были частично разрушены. Их и должны были восстанавливать приглашенные специалисты. Однако этому воспротивился член президиума Л. К. Мартенс, только что приехавший из США. Он был убежден, что вместо высококлассных специалистов со своим инструментом в Россию приедут авантюристы с целью подзаработать. Некоторые члены президиума (Богданов, Куйбышев и др.) хотели исполнить желание В. И. Ленина и осуществить его план. Несмотря на отрицательное голосование всех членов президиума, В. И. Ленин все же настоял на своем предложении, и для «пропаганды коммунизма» в Россию были приглашены 300 рабочих из США. Через 1,5 года Главхим и трест «Коксобензол» послали в Сибирь специальную комиссию для выяснения причин появления большого количества аварий на коксовых печах и низкого качества получаемого продукта (бензола). Комиссия обнаружила безобразное ведение производства, установила порчу оборудования и констатировала плохое качество кокса. Вскоре пришлось ликвидировать эту затею – американцев отправили домой, а печи передали в ведение Коксотреста. Только после этого работа по получению кокса и углеводородов была налажена.

В ноябре 1920 г. Совет народных депутатов опубликовал декрет «Общие экономические и юридические условия концессий», в котором были указаны не только условия заключения концессий, но и объекты, которые могут быть предложены зарубежным капиталистам (Приложение XIII). 15 ноября 1921 г. СНК своим постановлением организовал концессионную комиссию при Госплане (Концесском), в задачи которой входила организация работы по заключению концессионных договоров между советскими государственными предприятиями и зарубежными инвесторами. Руководителем Концессионного комитета был назначен Б. А. Ландау. На первом этапе работы Концесскома все концессионные предложения

¹ В. Смушков. Экономическая политика СССР. Харьков: Пролетарий; 1925. 365 с.

Таблица 1. Распределение поступивших в Главконцесском предложений по хозяйственным годам**Table 1. Distribution of proposals received by Glavkontsesssky by financial years**

1921/1922	1922/1923	1923/1924	1924/1925	1925/1926	1926/1927	1927/1928	Всего
224	579	396	256	482	263	200	2400

носили случайный характер, сказывалось отсутствие опыта. Но несмотря на вынужденные задержки в 1921 г., все же было предоставлено 18 концессий. К середине 1922 г. в эту организацию поступило 122 предложения, к концу года их было уже 207. Характер этих предложений становился все более серьезным. В итоге в течение 1923 г. количество предложений по заключению концессионных договоров с государственными заводами перевалило за 600. К сожалению, не удалось найти какую-либо информацию о подобных сделках в химической промышленности.

Согласно другому источнику¹, в течение 1922–1928 гг. в Главконцесском поступило 2400 предложений на заключение концессионных соглашений по всем отраслям народного хозяйства (таблица 1).

¹ Л.Я. Эвентов. Иностранные капиталы в русской промышленности. М.-Л.: Государственное социально-экономическое издательство; 1931. 104 с.

С целью устранения проволочек и бюрократизма осенью 1921 г. президиум ВСНХ сделал попытку объединить комиссариаты торговли и промышленности в один, предоставив трестам возможность в известных пределах делать закупки иностранного оборудования для быстрого восстановления своих заводов. Но, к сожалению, сделать это не удалось, т. к. Совнарком такое постановление не утвердил.

В 1920 г. Научно-техническим бюро ВСНХ было образовано государственное учреждение «Бюро иностранной научно-технической помощи для СССР» (БИНТ). Его главной задачей было установление связей между нашими и зарубежными научными институтами с целью собирания всевозможных сведений, полезных для научных исследований в СССР. Уже через год в штате этой организации находилось около 100 сотрудников и планировалось его дальнейшее расширение.

Рекламная статья / Sponsored article

ФГУП «Федеральный Центр по проектированию и развитию объектов ядерной медицины» ФМБА России – индикатор развития ядерной медицины в России



ФГУП | ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ПО ПРОЕКТИРОВАНИЮ И РАЗВИТИЮ
ОБЪЕКТОВ ЯДЕРНОЙ МЕДИЦИНЫ
ФМБА России

**С. В. Лосева, О. Н. Илющенко, А. В. Антонюк, Т. В. Кишкина, О. А. Нагурный,
М. А. Золотарев, М. В. Горячева, А. В. Зверев, Ю. В. Рангаев**

Авторы подготовили статью при финансовой поддержке ФГУП «Федеральный центр по проектированию и развитию объектов ядерной медицины» ФМБА России

ФГУП «Федеральный центр по проектированию и развитию объектов ядерной медицины» ФМБА России, ведущий российский производитель терапевтических РФЛП, в этом году отмечает 55-летний юбилей. Предприятие стояло у истоков становления ядерной медицины в России, являлось и по настоящее время остается самым крупным производителем терапевтических РФЛП в нашей стране. История развития предприятия – это история развития ядерной медицины в России. В данной статье мы хотим представить анализ накопленного за годы работы предприятия производственного опыта – основные достижения и сложности, которые приходилось преодолевать. А также взаимосвязь истории функционирования предприятия с общими тенденциями развития ядерной медицины в России.

Federal State Unitary Enterprise "Federal Center of Nuclear Medicine Projects Design and Development" of FMBA of Russia as a Benchmark of the Nuclear Medicine Evolution in Russia

**Svetlana V. Loseva, Olga N. Ilyushchenko, Alla V. Antonyuk, Tamara V. Kishkina,
Oleg A. Nagurnyy, Maxim A. Zolotarev, Maria V. Goryacheva, Alexandr V. Zverev, Yuriy V. Rangaev**

The authors prepared the article with the financial support of Federal State Unitary Enterprise "Federal center of nuclear medicine projects design and development" of FMBA of Russia

Federal State Unitary Enterprise "Federal center of nuclear medicine projects design and development" of FMBA of Russia is the leading Russian manufacturer of therapeutic radiopharmaceutical preparations (RPP) is celebrating its 55th anniversary this year. The Enterprise was at the origin of the development of nuclear medicine in Russia and remains the largest manufacturer of therapeutic RPPs in our country. The account of the company's evolution is the story of the advancement of nuclear medicine in Russia. In the present article, we offer an analysis of the production experience the company accumulated over the years of operation as well as the major achievements and hardships the Enterprise dealt with. We put a special emphasis on the reciprocity of the Enterprise's background and progress with general trends in the development of nuclear medicine in Russia.

ВВЕДЕНИЕ

Успех в лечении онкологических заболеваний в настоящее время невозможен без развития ядерной медицины. Развитие этой высокотехнологичной области медицины напрямую связано с развитием предприятий и организаций, которые способны производить эффективные и безопасные современные радиофармацевтические лекарственные препараты (РФЛП) для радионуклидной диагностики и терапии онкологических и других тяжелых заболеваний.

ФГУП «Федеральный центр по проектированию и развитию объектов ядерной медицины» ФМБА России (до 2010 года ФГУП «Завод «Медрадиопрепарат» ФМБА России) (далее – Предприятие) – один из са-

мых крупных российских производителей радиофармацевтических лекарственных средств (РФЛС). На сегодняшний день Предприятие является держателем тринадцати регистрационных удостоверений (РУ) на РФЛП. Являясь флагманом в производстве терапевтических РФЛП в России, ФГУП «Федеральный центр по проектированию и развитию объектов ядерной медицины» ФМБА России в значительной степени отражает современное состояние ядерной медицины в России.

В этом году Предприятие отмечает 55-летие. В данной статье представлен анализ производственного опыта, полученного Предприятием за эти годы во взаимосвязи с общими тенденциями развития ядерной медицины в нашей стране.

Отдельный раздел посвящен оценке перспектив развития предприятия в аспекте современных научных тенденций в области радионуклидной диагностики и терапии, современных международных законодательных и регуляторных требований к производителям лекарственных средств для медицинского применения.

ОСНОВНЫЕ ИСТОРИЧЕСКИЕ ВЕХИ. АНАЛИЗ НАКОПЛЕННОГО ОПЫТА

1 апреля 1967 года на базе производственно-го сектора Препарационной лаборатории Института биофизики МЗ СССР в соответствии с приказом Министра здравоохранения СССР от 17 марта 1967 г. № 45 создано производственное предприятие – Завод медицинских радиоактивных препаратов «Медрадиопрепарат» с одновременным выполнением функций опытной производственной базы Отдела радиофармпрепаратов Института биофизики. Основным назначением предприятия на тот момент была постановка на серийное производство препаратов, меченных радиоактивными изотопами, наборов реагентов для приготовления РФЛП в медицинских учреждениях, радиоизотопных генераторов и источников ионизирующего излучения для нужд отечественной медицины по технологиям, разработанным в Институте биофизики.

Завод «Медрадиопрепарат» (далее по тексту – Завод) стал первым и в течение 10 лет оставался единственным производственным предприятием, специализирующимся на выпуске радиофармацевтических лекарственных средств. Основные события за период работы Предприятия представлены в таблице 1.

В разные годы на нашем Предприятии серийно выпускались РФЛС, содержащие более тридцати четырех наименований радионуклидов. Перечень РФЛС, производимых наибольшими сериями, за период 1969–2022 гг. представлен в таблице 2. Также осуществлялись внедрение и постановка на серийное производство новых препаратов, разработанных специалистами Института Биофизики.

С 1970 по 1990 гг. Завод являлся основным поставщиком РФЛП, наборов реагентов для приготовления РФЛП в клиниках и изотопных генераторов. Осуществлялось серийное производство свыше 80 % от общего объема всех РФЛП, используемых в лечебных учреждениях нашей страны. Продукция Завода направлялась в более чем 400 медицинских учреждений, а также на экспорт в Болгарию, Венгрию, Вьетнам, Германию, Кубу, Монголию, КНДР, Польшу, Румынию, Чехословакию. В общей сложности на Заводе было внедрено и налажено серийное производство более 100 различных РФЛС. Все препараты проходили доклинические и клинические испытания, подготовку регистрационных досье, процесс регистрации в МЗ СССР, после чего они разрешались к медицинскому применению и выпускались в соответствии с ВФС (Временная Фармакопейная Статья), срок дейст-

вия которой был ограничен 1 годом. В связи с этим, Завод постоянно проводил работу для подтверждения разрешения к медицинскому применению выпускаемых РФЛП и получению бессрочных регистрационных удостоверений.

С 1990 года в условиях усиливающегося экономического кризиса в стране и вследствие вызванного этим значительного уменьшения применения РФЛП в лечебных учреждениях, произошло существенное снижение объемов производства – по сравнению с уровнем 1986 года уменьшилось более чем в 100 раз. Для преодоления экономического кризиса была обновлена номенклатура РФЛС и начато внедрение в производство более современных и востребованных в клиниках короткоживущих диагностических препаратов, меченных йодом-123, а также терапевтического препарата на основе стронция-89. В результате проведенной работы к 1999 году удалось стабилизировать ситуацию на Предприятии и увеличить объем производства к 2000 году. В это же время произошли значительные изменения в области законодательства, был принят Федеральный закон от 22 июня 1998 г. № 86-ФЗ «О лекарственных средствах», в котором РФЛП были отнесены к лекарственным средствам с общим порядком регистрации (в том числе и клинических исследований), что усложнило развитие производства в части возможностей расширения номенклатуры и внедрения в производство новых РФЛП.

В 2000 году в ядерной медицине начинается активное развитие диагностических методов с использованием позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ и ПЭТ/КТ). При лечебных учреждениях открывается множество ПЭТ – центров, в которых изготавливают диагностические РФЛП с ультракороткоживущими изотопами – ^{18}F , ^{11}C , ^{14}N . Востребованность некоторых диагностических препаратов, производимых нашим Предприятием, снижается, при этом востребованность терапевтических РФЛП увеличивается.

В 2000–2009 гг. для увеличения производственных мощностей осуществлен ремонт ряда помещений Предприятия, частично проведено техническое переоснащение Завода без остановки производства. Успешно подтверждена регистрация в Министерстве здравоохранения Российской Федерации всех препаратов в номенклатуре предприятия, получено 13 бессрочных регистрационных удостоверений. Таким образом, к данному периоду времени произошла естественная оптимизация номенклатуры Предприятия – в связи с развитием ПЭТ технологий исчезла необходимость в большой номенклатуре ультракороткоживущих диагностических препаратов, что позволило сосредоточиться на серийном выпуске наиболее востребованных лечебными учреждениями препаратов для диагностики на основе ^{123}I , ^{67}Ga и препаратов для терапии на основе ^{131}I , ^{89}Sr .

Накопленный к этому моменту уникальный производственный, экспериментальный, методический опыт и компетенции позволили начать собственные разработки новых, в первую очередь, терапевтических препаратов на основе ^{188}Re , ^{177}Lu и перспективных активных фармацевтических субстанций с ради-

Таблица 1. Основные вехи развития Предприятия

Table 1. Key development milestones of the Enterprise

Временной период Time period	Наименование предприятия Company name	Основные события Main events
1 апреля 1967 г. 1 April, 1967	Завод медицинских радиоактивных препаратов (Медрадиопрепарат) МЗ СССР Medical Radioactive preparations Factory (Medradiopreparat) of the Ministry of Health of the USSR	Создание первого в СССР Завода по производству РФЛП и источников для медицинского применения на базе препаративной лаборатории Института биофизики МЗ СССР Establishment of the first Factory in the USSR for the production of radiopharmaceutical preparations (RPP) and sources for medical use on the basis of the preparation laboratory of the Institute of Biophysics of the Ministry of Health of the USSR
1970–1979 гг. 1970–1979	«Завод «Медрадиопрепарат» МЗ СССР "Zavod "Medradiopreparat" Factory of the Ministry of Health of the USSR	Внедрение в производство и промышленный выпуск РФЛП на основе 34 видов изотопов. Поставки продукции более чем в 500 медицинских учреждений Implementation and industrial production of RPPs based on 34 types of isotopes. Supply of products to more than 500 healthcare facilities
1980–1989 гг. 1980–1989	«Завод «Медрадиопрепарат» МЗ СССР "Zavod "Medradiopreparat" Factory of the Ministry of Health of the USSR	Внедрение технологии получения РФЛП. Таллия хлорид, ^{201}Tl . Производство 134 видов продукции. Выпуск 100 тыс. упаковок РФЛС в год Implementation of Thallium chloride, ^{201}Tl . RPP preparation technology. Formulation of 134 types of products. Production of 100 thousand packages of RPPs per year
1990–1999 гг. 1990–1999	«Завод «Медрадиопрепарат» Главного управления медико-биологических и экстремальных проблем при МЗ РСФСР "Zavod "Medradiopreparat" Factory of the Main Department for Medico-Biological and Extreme Problems at the Ministry of Health of the RSFSR	Падение производства в 100 раз. Запуск производства препаратов с изотопами ^{123}I и ^{89}Sr A 100-fold drop in production capacity. Launch of production of RPPs with isotopes ^{123}I and ^{89}Sr
2000–2009 гг. 2000–2009	ФГУП «Завод «Медрадиопрепарат» Федерального управления медико-биологических и экстремальных проблем при МЗ РФ» FSUE "Zavod "Medradiopreparat" of the Federal Department for Medico-Biological and Extreme Problems of the Russian Academy of Sciences at the Ministry of Health of the Russian Federation" ФГУП «Завод «Медрадиопрепарат» ФМБА России Federal State Unitary Enterprise "Zavod "Medradiopreparat" of FMBA of Russia	Модернизация и переоснащение производства без остановки выпуска РФЛС. Подтверждение регистрации препаратов, получение бессрочных регистрационных удостоверений на наибольшее число препаратов. Разработка технологии производства терапевтического РФЛП «Натрия йодид, ^{131}I » в лекарственной форме капсулы Upgrading and re-equipment of the manufacture without an interruption of the production of RPPs. Authorization of drug registration, acquiring of open-ended registration certificates for the majority of drug entities. Development of the "Sodium iodide, ^{131}I " RPP production technology in a capsule drug formulation
2010–2017 гг. 2010–2017	ФГУП «Федеральный центр по проектированию и развитию объектов ядерной медицины» ФМБА России с производственной площадкой – филиал «Завод Медрадиопрепарат», г. Москва Federal State Unitary Enterprise "Federal center of nuclear medicine projects design and development" of FMBA of Russia with a production site-branch "Zavod "Medradiopreparat", Moscow	Образование Федерального центра, начало деятельности по проектированию объектов ядерной медицины, в том числе специализированных лечебных учреждений. Реконструкция предприятия с полной остановкой производства РФЛС (2010–2011 гг.). Возобновление выпуска РФЛС. Получение бессрочной лицензии на производство лекарственных средств. Собственные разработки терапевтических РФЛС с изотопами ^{188}Re , ^{177}Lu Inauguration of the Federal Center; inception of activities for the design of nuclear medicine facilities, including specialized medical institutions. Reconstruction of the enterprise with a complete shutdown of RPPs production (years 2010–2011). Resumption of RPPs production. Obtaining an open-ended license for the production of medicines. Proprietary development of therapeutic RPPs with ^{188}Re , ^{177}Lu isotopes

онуклидами для последующего изготовления из них РФЛП в клиниках. Для проведения исследований и фармацевтической разработки в структуре Предприятия в 2000 году образован научно-исследовательский отдел.

В 2010 году на базе Завода создается ФГУП «Федеральный центр по проектированию и развитию объектов ядерной медицины» ФМБА России (далее по тексту – Центр), с производственной площад-

кой – филиалом «Завод «Медрадиопрепарат», г. Москва. Таким образом, Предприятие расширяет свои компетенции – добавив еще один вид деятельности – проектирование и строительство объектов ядерной медицины, к которым относятся специализированные лечебные учреждения с возможностью проведения процедур радионуклидной диагностики и терапии.

Таблица 2. Перечень* РФЛС, производимых ФГУП Федеральный центр по проектированию и развитию объектов ядерной медицины ФМБА России из различных изотопов в период с 1969–2022 гг.

Table 2. *List of RPs produced by the Federal State Unitary Enterprise "Federal center of nuclear medicine projects design and development" of FMBA of Russia from various isotopes in the time period of 1969–2022

№ п/п №	Наименование РФЛС, лекарственная форма RPPs name, dosage form	Область применения Scope of application	Даты начала и окончания производства РФЛС RPP production start and end dates
1	Натрия хлорид, ^{24}Na раствор для инъекций Sodium Chloride, ^{24}Na injection solution	РНД в кардиологии RND in cardiology	Выпускались в 1969–1980 гг., в настоящее время не востребованы лечебными учреждениями Manufactured in the period of 1969–1980, currently not in demand by health-care facilities
2	Калия хлорид, ^{42}K , раствор для инъекций Potassium chloride, ^{42}K , injection solution		
3	Рубидия хлорид, ^{86}Rb , раствор для инъекций Rubidium chloride, ^{86}Rb , injection solution		
4	Натрия фосфат, ^{32}P , изотонический раствор для инъекций Sodium phosphate, ^{32}P , isotonic injection solution	РНД и РНТ заболеваний скелета RND and RNT in skeletal diseases	
5	Кофоцит, ^{32}P , набор для получения РФЛП Cofocyte, ^{32}P , a kit for RPP design	РНД и РНТ заболеваний печени RND and RNT in liver diseases	
6	Котрисилит, ^{90}Y набор для получения РФЛП Cotrisilite, ^{90}Y a kit for RPP design	РНД и РНТ опухолей и суставов RND and RNT in neoplasms and skeletal joints	
7	Смесь воздушно-ксеноновая, ^{133}Xe Air-xenon mixture, ^{133}Xe	РНД заболеваний органов дыхания RND in respiratory diseases	
8	Меди хлорид, изотонический раствор, ^{64}Cu , раствор для инъекций Copper chloride, isotonic solution, ^{64}Cu , injection solution	РНД головного мозга RND in the brain	
9	Раствор коллоидного палладия, ^{103}Pd Colloidal palladium solution, ^{103}Pd	РНД опухолей RND in neoplasms	
10	Натрия фторид б/н в изотоническом растворе, ^{18}F , раствор для инъекций Sodium fluoride b/n in isotonic solution, ^{18}F , injection solution	РНД опухолей RND in neoplasms	
11	Кальция хлорид, изотонический, ^{45}Ca , раствор для инъекций Calcium chloride, isotonic, ^{45}Ca , injection solution	РНД и РНТ заболеваний скелета RND and RNT in skeletal diseases	
12	Раствор коллоидного золота, ^{198}Au , раствор для внутривенного введения Colloidal gold solution, ^{198}Au , intravenous administration solution	Определение кровотока печени, функции РЭС, сканирование лимфатических узлов, РНТ тканей, лимфатических сосудов Measurement of liver blood flow, RES function, scanning of lymph nodes, RNT of tissues, and lymph vessels	
13	Раствор стронция-85, изотонический, раствор для инъекций Strontium-85 solution, isotonic, injection solution	РНД заболеваний скелета RND in skeletal diseases	
14	Котех, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, набор для получения РФЛП Kotech, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Vehicle, RPP design kit	РНД заболеваний печени и селезенки RND in liver and spleen diseases	
15	Капсулы желатиновые с ^{51}Cr Gelatin capsules with ^{51}Cr	РНД РЭС, гематология RND in RES and hematology	
16	Генератор индия $^{113\text{m}}\text{In}$ Indium $^{113\text{m}}\text{In}$ Generator	Приготовление различных РФЛП для РНД Preparation of various RPPs for RND	Выпускался в 1976–1997 гг., в настоящее время не востребованы лечебными учреждениями Manufactured in the period of 1976–1997, currently not in demand by health-care facilities
17	Натрия пертехнетат, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, генераторный Sodium pertechnetate, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, generator	Приготовление различных РФЛП для РНД щитовидной железы Preparation of various RPPs for thyroid RND	Выпускался в 1969–2000 гг., технология передана предприятию ГК «Росатом» Manufactured in the period of 1969–2000, subsequently the technology was transferred to the GC "Rosatom" company

№ п/п №	Наименование РФЛС, лекарственная форма RPPs name, dosage form	Область применения Scope of application	Даты начала и окончания производства РФЛС RPP production start and end dates
18	Цианкобаламин (Витамин B ₁₂), ⁵⁸ Co Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂), ⁵⁸ Co	Оценка состояния гемопоэза и поджелудочной железы Assessment of hematopoiesis and pancreatic function	Выпускался в 1970–1990 гг., в настоящее время не востребован лечебными учреждениями Manufactured in the period of 1970–1990, currently not in demand by health-care facilities
19	Олитрол, ⁹¹ Y, набор для изготовления РФЛП Olitrol, ⁹¹ Y, RPP design kit	РНТ опухолей головного мозга RNT of brain tumors	Выпускались в 1981–1990 гг., в настоящее время не востребованы лечебными учреждениями Manufactured in the period of 1981–1990, currently not in demand by health-care facilities
20	Индипен, ^{113m} In, набор для получения РФЛП Indipen, ^{113m} In, RPP design kit	Исследование функции почек, радионуклидная ангиография Renal function study, radionuclide angiography	
21	Натрия о-йодгиппурат, ¹²⁵ I, раствор для инъекций Sodium o-iodine hippurate, ¹²⁵ I, injection solution	Оценка функционального состояния почек Assessment of the functional state of the kidneys	
22	Коинд, ¹¹¹ In Coind, ¹¹¹ In	РНД заболеваний печени и селезенки RND in liver and spleen diseases	
23	Альбумин, ¹³¹ I Albumin, ¹³¹ I	Исследование параметров гемодинамики Assesment of hemodynamic parameters	Выпускались в 1970–1990 гг., в настоящее время не востребованы лечебными учреждениями Manufactured in the period of 1970–1990, currently not in demand by health-care facilities
24	Бенгальская роза, ¹³¹ I Bengal Rose, ¹³¹ I	РНД гепатобилиарной системы RND of the hepatobiliary system	
25	Натрия о-йодгиппурат, ¹³¹ I, раствор для инъекций Sodium o-iodine hippurate, ¹³¹ I, injection solution	Оценка функционального состояния почек Assessment of the functional state of the kidneys	
26	Корен, ^{99m} Tc, набор для изготовления РФЛП Koren, ^{99m} Tc, RPP design kit	РНД заболеваний печени и селезенки RND in liver and spleen diseases	
27	Таллия хлорид, ²⁰¹ Tl Thallium chloride, ²⁰¹ Tl	РНД в кардиологии RND in cardiology	Выпускались в 1981–1990 гг., в настоящее время не востребованы лечебными учреждениями Manufactured in the period of 1981–1990, currently not in demand by health-care facilities
28	Железа сульфат, ⁵⁹ Fe, капсулы Iron sulfate, ⁵⁹ Fe, capsules	Гематология Hematology	Выпускался в 1981–2000 гг., в настоящее время не востребован лечебными учреждениями Manufactured in the period of 1981–2000, currently not in demand by health-care facilities
29	Галлия цитрат, ⁶⁷ Ga, раствор для инъекций Gallium Citrate, ⁶⁷ Ga, injection solution	РНД системных лимфопролиферативных заболеваний RND in systemic lymphoproliferative diseases	Выпускался в 1969–2017 гг., в настоящее время не востребован лечебными учреждениями Manufactured in the period of 1969–2017, currently not in demand by health-care facilities
30	Натрия о-йодгиппурат, ¹²³ I, раствор для инъекций Sodium o-iodine hippurate, ¹²³ I, injection solution	Оценка функционального состояния почек Assessment of the functional state of the kidneys	Выпускался в 2000–2020 гг., в настоящее время не востребован лечебными учреждениями Manufactured in the period of 2000–2020, currently not in demand by health-care facilities
31	Натрия перренат, ¹⁸⁸ Re, экстракционный раствор для приготовления РФЛП Sodium perrenate, ¹⁸⁸ Re, extraction solution for RPP preparation	Для изготовления терапевтических и диагностических РФЛП Production of therapeutic and diagnostic RPPs	Выпускается с 2012 г. по настоящее время Manufactured from 2012 to the present
32	Натрия йодид, ¹³¹ I, раствор для приема внутрь Sodium iodide, ¹³¹ I, oral solution	РНД и РНТ заболеваний щитовидной железы RND and RNT in thyroid diseases	Выпускается с 1970 г. по настоящее время Manufactured from 1970 to the present
33	Натрия йодид, ¹³¹ I, капсулы Sodium iodide, ¹³¹ I, capsules		Выпускается с 2000 г. по настоящее время Manufactured from 2000 to the present

Окончание таблицы 2

№ п/п №	Наименование РФЛС, лекарственная форма RPPs name, dosage form	Область применения Scope of application	Даты начала и окончания производства РФЛС RPP production start and end dates
34	Стронция хлорид, ^{89}Sr , раствор для инъекций Strontium chloride, ^{89}Sr , injection solution	РНД и паллиативная терапия при костных метастазах RND and palliative care for bone metastases	Выпускаются с 2000 г. по настоящее время Manufactured from 2000 to the present
35	Натрия йодид, ^{123}I изотонический, раствор для внутривенного введения и приема внутрь Sodium iodide, ^{123}I isotonic, solution for intravenous and oral administration	РНД заболеваний щитовидной железы RND in thyroid diseases	
36	МИБГ, ^{123}I , раствор для внутривенного введения MIBG, ^{123}I , solution for intravenous administration	Визуализация состояния симпатической нервной системы, РНД нейроэндокринных опухолей, в т. ч. в педиатрии Visualization of the sympathetic nervous system, RND of neuroendocrine tumors, in adult and pediatric patients	
37	Лютеция хлорид, ^{177}Lu , субстанция-раствор для приготовления РФЛП Lutetium chloride, ^{177}Lu , substance-solution for RPP preparation	Для изготовления терапевтических РФЛП Production of therapeutic RPPs	Выпускается с 2019 г. по настоящее время Manufactured from 2019 to the present
38	Натрия йодид, ^{131}I , субстанция-раствор для приготовления РФЛП Sodium iodide, ^{131}I , substance-solution for RPP preparation	Для изготовления терапевтических РФЛП Production of therapeutic RPPs	Выпускается с 2020 г. по настоящее время Manufactured from 2020 to the present

Примечание. РНД – радионуклидная диагностика; РНТ – радионуклидная терапия.

* Для составления таблицы использованы материалы статьи Г. Е. Кодиной «Институт биофизики – место рождения отечественной ядерной медицины». *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. № 5, 2016 г.

Note. RND – radionuclide diagnostics; RNT – radionuclide therapy.

* The data in the table are courtesy of G. E. Kodina "Institute of Biophysics – the Birthplace of the Homeland Nuclear Medicine". *Medical Radiology and Radiation Safety*. No. 5, 2016.

Период 2010–2017 годов стал самым непростым в истории Предприятия. В связи с расширением штата, необходимостью увеличения и модернизации производственных мощностей для наращивания объемов выпуска препаратов, связанной с меняющейся конъюнктурой рынка, а также необходимостью соответствия регуляторным требованиям в 2010–2011 годах прошла масштабная реконструкция производственных площадей с остановкой выпуска РФЛС почти на год. Сохранение квалифицированного коллектива в этот период, несмотря на продолжительный простой, позволило быстро запустить производство после проведения реконструкции. В первую очередь предприятие возобновило выпуск наиболее социально значимых и востребованных лечебными учреждениями препаратов. Возобновлено и автоматизировано производство РФЛП «Натрия йодид, ^{131}I », в лекарственной форме капсулы. Проведена перерегистрация данного препарата, получено бессрочное РУ.

Также в этот период произошли серьезные законодательные изменения в сфере обращения и производства лекарственных средств: в 2010 году вышел Федеральный закон № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», в котором законодательно закреплены две категории РФЛС – подлежащие и не подлежащие регистрации. В 2013 году вышел Приказ

Минпромторга РФ № 916 «Об утверждении правил организации производства и контроля качества лекарственных средств», в котором введены строгие требования к условиям производства РФЛС. Введение в действие этих нормативно правовых актов отразилось на деятельности всех производителей РФЛС, которым пришлось приводить и условия производства, и документацию в соответствие с новыми требованиями, что повлекло большие финансовые и персональные затраты и существенно замедлило внедрение новых препаратов в производство.

Наше предприятие не явилось исключением, был проведен большой объем работ – перерегистрация всей текущей номенклатуры РФЛС, пересмотр почти всей внутренней документации по системе обеспечения качества. Начата дополнительная реконструкция и переоснащение некоторых производственных помещений. Ввиду сложившейся ситуации внедрение в производство новых лекарственных средств в этот период не проводилось. Номенклатура предприятия сократилась до 12 наименований – основных, востребованных лечебными учреждениями диагностических и терапевтических лекарственных средств.

Приказ Министерства Здравоохранения РФ № 211н «Об утверждении Порядка изготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов не-

посредственно в медицинских организациях», опубликованный в 2015 году, определил упрощенный порядок изготовления РФЛП без регистрации, что способствовало расширению номенклатуры изготавливаемых препаратов и количества клиник-изготовителей и ПЭТ – центров.

КОЛЛЕКТИВ – ЗАЛОГ УСПЕХА РАЗВИТИЯ НАШЕГО ПРЕДПРИЯТИЯ

Особенностями производств радиофармацевтических лекарственных средств являются особые условия труда, связанные с использованием радиоактивных веществ, небольшие по количеству единиц выпускаемые серии, высокая частота выпуска серий (более десяти выпускаемых серий в неделю), короткий по времени (от одного до нескольких часов) производственный цикл. Эти особенности производства накладывают большую ответственность на персонал, который на предприятии всегда был высокой квалификации. Специалисты Завода стали пионерами в организации серийного производства и контроля качества РФЛС в нашей стране. С их помощью разрабатывались новые требования к организации и производству лекарственных средств с учетом специфики – радиоактивность.

Сотрудники Завода оказывали большую помощь в становлении отрасли по производству РФЛС, проводили передачу технологий и обучение специалистов других предприятий.

На Предприятии всегда большое внимание уделялось обучению и повышению квалификации персонала. В результате чего сформировался высококвалифицированный сплоченный коллектив инженерного и среднего персонала (рисунок 1). Некоторые специалисты работают на предприятии более 40 лет. За годы работы сотрудниками предприятия разработано и внедрено в серийное производство и контроль качества множество «ноу-хау». Это технологии, уникальное технологическое оборудование и приборы для контроля качества, которые позволили



Рисунок 1. Бригада аппаратчиков по производству препаратов с йодом-131

Figure 1. A team of specialist for the production of preparations with iodine-131

оптимизировать процесс производства, значительно уменьшить потери радиоактивного сырья, сократить время производства и вредное воздействие на персонал.

НАСТОЯЩЕЕ. ПЕРЕХОДНЫЙ ПЕРИОД

В настоящее время, несмотря на постоянную необходимость адаптации к быстро меняющимся реалиям, нашему Предприятию удастся осуществлять стабильный выпуск РФЛС в гражданский оборот в соответствии с номенклатурой предприятия, включающей в себя 6 наименований готовых лекарственных форм и 3 наименования активных фармацевтических субстанций. Сегодня предприятие выпускает более 320 серий РФЛС в год. Для осуществления полноценной производственной деятельности в соответствии с законодательством РФ предприятие имеет 4 соответствующие лицензии и заключения о соответствии требованиям федеральных норм и правил в области использования атомной энергии и государственным санитарно-гигиеническим нормам и правилам. Предприятие регулярно подтверждает свое соответствие всем необходимым требованиям, затрачивая на это временные, персональные и материальные ресурсы. Несмотря на имеющиеся сложности, наше предприятие продолжает внедрять в производство новые востребованные лечебными учреждениями РФЛС.

В 2019–2020 годы предприятие первым в России зарегистрировало две новые фармацевтические субстанции с радионуклидами ^{177}Lu и ^{131}I для приготовления радиофармацевтических лекарственных средств.

В период 2018–2022 годов проводится актуализация по действующей Фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) всех регистрационных досье на РФЛС. Пройдены две инспекции на подтверждение соответствия лицензионным требованиям на производство лекарственных средств для медицинского применения. Проводятся исследовательские работы по 6 новым РФЛП с радионуклидами ^{223}Ra , ^{177}Lu , ^{188}Re (рисунки 2, 3).

В связи с переходом на законодательство ЕАЭС в части регистрации лекарственных средств, условий их производства и изменениями в законодательстве о лицензировании производства лекарственных средств, на нашем предприятии активно ведутся работы по подготовке к переоформлению лицензии на производство лекарственных средств и к проверке на соответствие требованиям надлежащих производственных практик (GMP) ЕАЭС.

БУДУЩЕЕ. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Основной стратегией развития нашего Предприятия в сфере производства РФЛС в будущем является упор на расширение номенклатуры и объемов производства терапевтических лекарственных средств и



А
А



Б
В

Рисунок 2. Производственные помещения РФЛС
Figure 2. Industrial premises for the production of RPP

производства АФС с радионуклидами. АФС соответствуют требованиям Государственной Фармакопеи, могут использоваться как в условиях «ядерной аптеки» для изготовления персонализированных готовых лекарственных препаратов, так и для изготовления



Рисунок 3. Контроль качества РФЛС
Figure 3. RPP quality control

готовых лекарственных форм в специализированных отделениях лечебных учреждений, где они и будут применяться.

Задачи Предприятия на ближайшую перспективу:

- получение сертификата о Соответствии требованиям надлежащей производственной практики ЕАЭС;
- приведение регистрационных досье на все выпускаемые РФЛП в соответствие с требованиями ЕАЭС;
- разработка и внедрение в производство новых РФЛС с применением альфа-излучателей, РФЛП с применением «таргетных» носителей», «тераностических пар» (таблица 3);
- регистрация в странах ЕАЭС.

В заключение хотелось бы отметить, что за 55 лет наше Предприятие прошло путь от препаративной лаборатории – производственной площадки Института Биофизики МЗ СССР, на которую передавались технологии получения и контроля качества радиофармацевтических лекарственных средств, до современного предприятия полного цикла, обладающего широкими компетенциями в области научной и фармацевтической разработки, производства, контроля качества и регистрации инновационных радиофармацевтических лекарственных средств, а также в области проектирования объектов ядерной медицины, к которым относятся лечебные учреждения для радионуклидной диагностики и терапии.

Одним из основных факторов, влияющих на дальнейшее успешное развитие нашего предприятия, является преемственность поколений, которая обеспечивает сохранение и приумножение накопленных знаний и опыта в области производства РФЛС.

Однако, важно отметить, что успешное развитие таких уникальных предприятий и вместе с ними высокотехнологичной ядерной медицины требует боль-

Таблица 3. Препараты, находящиеся в разработке и на стадии клинических исследований на 2022–2023 годы

Table 3. Drugs under development and at the stage of clinical trials for the time period of 2022–2023

№ п/п №	Наименование РФЛС RPP name	Стадия внедрения Implementation stage	Область применения Scope of application
1	MCA 20-40, ¹⁸⁸ Re MSA 20-40, ¹⁸⁸ Re	Производство препарата для КИ Manufacture of the drug for a clinical trial	РНТ* первичной гепатоцеллюлярной карциномы и метастатических образований в печени RNT of primary hepatocellular carcinoma and metastatic lesions in the liver
2	MCA 5 – 10, ¹⁸⁸ Re MSA 5-10, ¹⁸⁸ Re	Производство препарата для КИ Manufacture of the drug for a clinical trial	РНТ воспалительных заболеваний суставов RNT in inflammatory joint diseases
3	DOTA-PSMA, ¹⁷⁷ Lu	Производство препарата для КИ Manufacture of the drug for a clinical trial	РНТ рака предстательной железы RNT of Prostate Cancer
4	DOTATATE, ¹⁷⁷ Lu (дженерик Lutathera) DOTATATE, ¹⁷⁷ Lu (Lutathera generic)	Разработка технологии Technology development	РНТ нейроэндокринных опухолей различных локализаций RNT of neuroendocrine neoplasms in various tumor sites
5	Радия хлорид, ²²³ Ra (дженерик Ксофиго) Radium chloride, ²²³ Ra (Xofigo generic)	Разработка технологии Technology development	РНТ кастрационно-резистентного рака предстательной железы с метастазами в кости скелета RNT of castration-resistant prostate cancer with bone metastases

ших вложений, как в процесс совершенствования материально-технической базы и научные исследования, так и в процессы последующей регистрации РФЛС. С учетом политики государства о доступности высокотехнологичной медицинской помощи для населения производство РФЛС не является быстро окупаемой сферой деятельности и не приносит быстрой коммерческой выгоды. Поэтому для дальнейшего раз-

вития Предприятия необходимо содействие государства, как в области законодательного регулирования (гармонизация законодательства и снижение излишней «зарегулированности»), так и финансовой поддержки инновационных исследований и увеличения числа лечебных учреждений, способных оказывать высокотехнологичную помощь – радионуклидную диагностику и терапию.



Регистрационная запись ФС-001869

^{177}Lu

Лютеция хлорид, ^{177}Lu ,

субстанция-раствор для
приготовления
радиофармацевтических
лекарственных препаратов



Натрия йодид, ^{131}I ,

лекарственная форма
капсулы



Регистрационное удостоверение ЛСР-003509/07



www.fcpr.ru

55

ЛЕТ НА РЫНКЕ

© ФГУП «Федеральный центр по
проектированию и развитию объектов
ядерной медицины» ФМБА России

Рекламная статья / Sponsored article

Делая все возможное: контроль качества противовирусных вакцин при помощи Litesizer



Авторы подготовили статью при финансовой поддержке компании ООО «АВРОПА»

Размер частиц в вакцинах оказывает значительное влияние на их время полувыведения *in vivo*, а также на поглощение антигенпрезентирующими клетками. Предполагается, что на те же параметры влияет и поверхностный заряд частиц. В данном отчете для определения размера и дзета-потенциала частиц двух инактивированных противовирусных вакцин используются методы ДРС и ЭРС соответственно. Вакцина против клещевого энцефалита (КЭ) показывает мономодальное распределение размеров частиц в нижнем микрометрическом диапазоне, что соответствует ожидаемому размеру адъюванта на основе соли алюминия. Вакцина против гриппа на основе клеток, напротив, содержит как отдельные вирусы (примерно 30 нм), так и более крупные агрегаты (примерно 250 нм). Измерения дзета-потенциала показывают, что обе вакцины состоят из слабоанионных частиц. Интересно, что моделируемые нарушения холодовой цепи (тепловая обработка, замораживание-оттаивание) вызывают значительные изменения в распределении размеров частиц обеих вакцин.

Doing Our Best: Quality Control Antiviral Vaccines with Litesizer

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

The particle size of vaccines has a considerable influence on their half-life *in vivo*, as well as on their uptake by antigen-presenting cells. The surface charge of particles is also suspected of influencing the same parameters. Here we use DLS and ELS to characterize respectively the particle size and zeta potential of two inactivated antiviral vaccines. A tick-borne encephalitis (TBE) vaccine displays a monomodal particle size distribution in the lower micrometer range, corresponding to the expected size of the aluminum salt adjuvant. A cell-based influenza vaccine, in contrast, is shown to contain both split viruses (ca. 30 nm) and larger aggregates (ca. 250 nm). Zeta potential measurements indicate that both vaccines consist of weakly anionic particles. Interestingly, we demonstrate that simulated cold chain disruptions (heat treatment, freeze-thawing) induce significant changes in the particle size distribution of both vaccines.

ВВЕДЕНИЕ

Вакцины часто являются единственным рубежом защиты от вирусных инфекций, поскольку диапазон доступных в настоящее время противовирусных препаратов и эффективность лечения ограничены. Иначе обстоит дело с бактериальными инфекциями, когда антибиотики являются эффективным терапевтическим вмешательством.

Противовирусные вакцины могут состоять из живых возбудителей с ослабленной вирулентностью, которые вызывают у реципиента вялотекущую инфекцию. Хотя эта стратегия способна очень точно имитировать инфекцию, вызванную патогеном, и обычно вызывает очень устойчивый иммунный ответ, она может вызвать серьезные побочные эффекты у лиц с ослабленным иммунитетом.

Таким образом, большинство противовирусных вакцин в настоящее время производятся в формуляциях, не обладающих потенциалом репликации в организме реципиента. Они варьируются от химически инактивированных целых или расщепленных вирусов до рекомбинантных белков или вирусоподобных частиц, полученных методами генной инженерии. Хо-

тя такие вакцины характеризуются лучшим профилем безопасности, они также имеют тенденцию вызывать более слабые иммунные ответы, чем их ослабленные живые аналоги. Следовательно, многие из них вводятся вместе с так называемыми адъювантами вакцины, которые увеличивают эффективность и продолжительность иммунного ответа.

Самым давним и все еще наиболее популярным таким адъювантом является соль алюминия (например, гидроксид или гидроксифосфат алюминия). Считается, что его иммуностимулирующие свойства связаны как с его способностью адсорбировать и удерживать антигены в течение длительного времени в месте инъекции, так и со способностью активировать локальное высвобождение провоспалительных медиаторов¹.

На иммуногенность вакцины значительное влияние оказывает размер ее частиц. Вирусы, за некоторыми исключениями, представляют собой наночастицы размером от 15 до 300 нм. После инъекции час-

¹ Shardlow E., Mold M., Exley C. From stock bottle to vaccine: elucidating the particle size distributions of aluminum adjuvants using dynamic light scattering. *Frontiers in Chemistry*. 2017;4:48.

тицы в этом диапазоне размеров эффективно захватываются дендритными клетками, классом иммунных клеток, обладающих уникальной способностью индуцировать иммунитет, опосредованный как антителами, так и клетками-киллерами¹. Напротив, частицы в микрометровом диапазоне размеров, например, частицы солей алюминия, поглощаются преимущественно моноцитами и макрофагами, вызывающими в основном опосредованный антителами иммунный ответ.

Принимая во внимание, что распределение различных классов иммунных клеток в организме сильно тканеспецифично, размер частиц вакцины должен быть адаптирован:

- Основываясь на типе иммунного ответа, необходимого для борьбы с патогеном.
- Или
- В зависимости от пути доставки вакцины.

Динамическое рассеяние света (ДРС) – это быстрый и неразрушающий метод измерения, который выявляет распределение частиц по размерам в диапазоне от долей нанометра до нескольких микрометров, что делает ДРС предпочтительным методом контроля качества противовирусных вакцин².

В данном отчете показана способность Litesizer определять размер частиц двух противовирусных вакцин: вакцины против клещевого энцефалита (КЭ) с адъювантом в виде солей алюминия и инактивированной сплит-вакцины против гриппа без адъюванта. Были смоделированы нарушения холодовой цепи с целью сравнения образцов, хранившихся в оптимальных условиях с образцами, прошедшими термообработку или подвергнутыми циклу замораживания-оттаивания.

Кроме того, для оценки дзета-потенциала частиц вакцины были проведены измерения методом ЭРС, что обеспечило дополнительные сведения о стабильности препаратов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы

- Вакцина против клещевого энцефалита (FSME-Immun®, Pfizer, Австрия).

Инактивированная вакцина на основе штамма клещевого энцефалита Neudörfl. Вирус реплицируется в фибробластах куриного эмбриона и инактивируется формальдегидом. Гидроксид алюминия используется в качестве адъюванта, а сывороточный альбумин че-

ловека – в качестве стабилизатора. Одна доза состоит из 2,4 мкг вирусного антигена в 0,5 мл разбавителя³.

- Вакцина против вируса гриппа (Flucelvax®, Seqirus, USA).

Четырехвалентная вакцина против гриппа, содержащая 2 штамма вирусов гриппа А и 2 штамма вирусов гриппа В, в соответствии с рекомендациями ВОЗ на сезон гриппа 2019–2020 гг. в северном полушарии. Вирусы реплицируются в непрерывной клеточной линии MDCK, инактивированы β-пропиолактоном, разрушены детергентом и очищены. Одна доза рассчитана на содержание 15 мкг вирусного гемагглютинина (НА) от каждого вирусного штамма или 60 мкг общей НА в 0,5 мл⁴.

Подготовка образцов

Перед обработкой вакцины хранили в исходном состоянии при +4 °С в соответствии с рекомендациями производителя. Затем каждый образец был разделен на 3 части в стерильных микропробирках, которые хранили следующим образом:

- Один образец продолжили хранить при оптимальной температуре +4 °С («нетронутый» образец).
- Другой выдержали в сухожаровом шкафу при 50 °С в течение 24 часов («перегретый» образец).
- Третий заморозили при температуре –18 °С в течение 24 часов, после чего разморозили при температуре +4 °С («переохлажденный образец»).

Все три образца контролировали параллельно спустя 24–28 часов после вскрытия оригинальной упаковки.

Измерения ДРС

Для анализа методом ДРС образцы вакцины против клещевого энцефалита разводили в стерильном физиологическом растворе (0,9 % NaCl) в 10 раз. Образцы вакцины против гриппа разбавляли в 5 раз стерильным физиологическим раствором. Данные разведения были признаны оптимальными для измерений ДРС в предварительном эксперименте (данные не приводятся).

Измерения проводились на приборе Anton Paar Litesizer 500. Для проведения эксперимента применялись кварцевые кюветы благодаря их превосходным оптическим качествам и пониженной адсорбцией белка по сравнению с одноразовыми (полистирольными) кюветами.

Измерения проводили при 25 °С, под углом 175° (режим обратного рассеяния) и с использованием ручного режима качества измерения (12 сканирований, по 10 секунд на цикл). Затенение оптического

¹ Etchart N., et al. Dendritic cells recruitment and in vivo priming of CD8+ CTL induced by a single topical or transepithelial immunization via the buccal mucosa with measles virus nucleoprotein. *Journal of Immunology*. 2001;167:384–391.

² Slütter B., Jiskoot W. Sizing the optimal dimensions of a vaccine delivery: a particulate matter. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2016;13:167–170.

³ World Health Organization (WHO). Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*. 2011;86:241–256.

⁴ Lamb Y. N. Cell-Based Quadrivalent Inactivated Influenza Virus Vaccine (Flucelvax® Tetra/Flucelvax Quadrivalent®): A Review in the Prevention of Influenza. *Drugs*. 2019;79:1337–1348.

фильтра и положение фокуса выбирались прибором автоматически.

Серии состояли минимум из 5 и максимум из 8 последовательных измерений. Результаты были усреднены по всему измерению. Статистическая значимость определялась при помощи двухвыборочного t-критерия (случай неравных дисперсий). Различия между наборами данных считались значимыми, когда возвращаемое р-значение составляло $<0,05$.

Измерения ЭРС

Образцы анализировались в исходном неразбавленном виде с использованием Univette и адаптера малого объема (объем образца: 50 мкл).

Измерения дзета-потенциала выполнялись на приборе Litesizer 500 при 25 °C и с использованием режима «Белок», который обеспечивает небольшие перерывы между измерениями и, следовательно, уменьшает термическое воздействие на образец. Напряжение автоматически устанавливалось прибором. Качество измерений настраивали в режиме с установкой по 200 сканирований на измерение.

Серии состояли из 5 последовательных измерений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерение размера частиц образцов вакцины против клещевого энцефалита

Как показано на рисунке 1, взвешенное по интенсивности распределение частиц по размерам должным образом хранившейся вакцины против клещевого энцефалита (КЭ) «необработанный» образец (зеленая кривая) имеет единственный пик, достигающий максимума между 2 и 3 мкм, что соответствует известному размеру частиц коммерческого гидроксида алюминия, используемого в качестве адъюванта и находящегося в нижнем микрометровом диапазоне размера частиц.

Кроме того, гранулометрический состав обеих средних кривых (рисунок 1) и всех отдельных измерений (не показан) полностью лишен пиков в диапазоне размеров от 0 до 1000 нм. Это указывает на то, что вирусные частицы не обнаруживаются как свободно движущиеся объекты и, вероятно, в подавляющем большинстве адсорбируются на частицах адъюванта.

Распределение размеров частиц как замороженных, так и перегретых образцов вакцины показывает мономодальные распределения слегка увеличенных размеров (см. рисунок 1). Это подтверждается показателями гидродинамического диаметра (ГДД), полученными для этих образцов (таблица 1, рисунок 2). Действительно, среднее значение ГДД образца, подвергнутого замораживанию-оттаиванию, плавно, но значительно увеличено по сравнению с необработанным образцом, с 3030 до 3582 нм ($P < 0,05$).

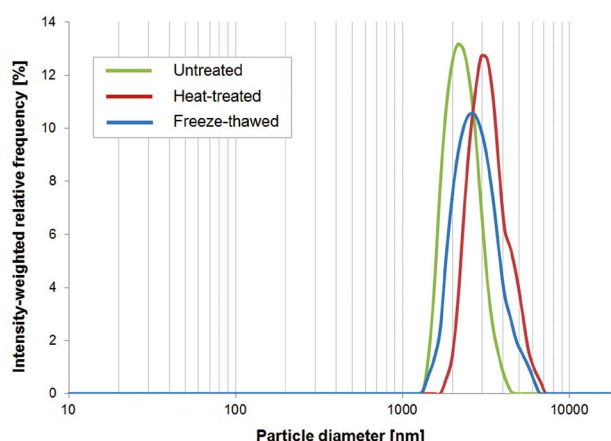


Рисунок 1. Взвешенное по интенсивности распределение частиц по размерам вакцины против КЭ, хранившейся должным образом (зеленый график), перегретой (красный график) и подвергнутой заморозке (синий график). Кривые являются усредненными по 5–8 последовательным измерениям

Figure 1. Intensity-weighted particle size distributions of TBE vaccine samples, either untreated (green), heat-treated (red), or freeze-thawed (blue). Curves represent the averages from 5 to 8 consecutive measurements

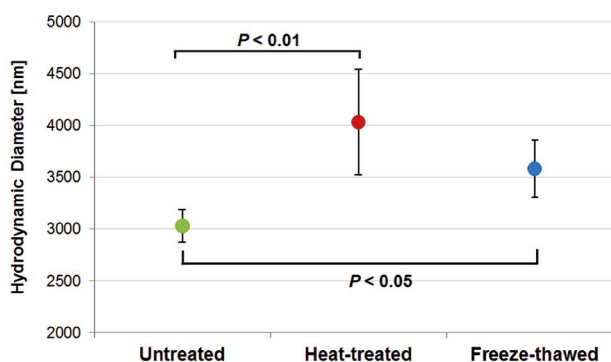


Рисунок 2. Результаты определения гидродинамического диаметра образцов вакцины от КЭ. Определенная стандартным t-тестом статистическая значимость разных наборов данных приведена в соответствующих скобках

Figure 2. Hydrodynamic diameter results for untreated, heat-treated and freeze-thawed TBE vaccine samples. Statistical significance between the different data sets, as determined by standard t-test, is shown on the relevant brackets

Термообработанный образец демонстрирует более выраженное увеличение ГДД с 3030 до 4030 нм ($P < 0,01$).

Следует отметить, что стандартное отклонение ГДД для термообработанного образца намного больше, чем для необработанного образца (см. рисунок 2). Такая субоптимальная воспроизводимость предполагает, что Litesizer обнаруживает очень большие агрегаты в термообработанном образце, которые невозможно точно определить, поскольку они превышают предел обнаружения Litesizer в 10 мкм.

Таблица 1. Результаты определения гидродинамического диаметра образцов вакцины от КЭ. Показатели являются усредненными по 5–8 измерениям

Table 1. Hydrodynamic diameter (HDD) results for untreated, heat-treated or freeze-thawed TBE vaccine samples. Averages from 5 to 8 consecutive measurements

Параметр Parameter	Образец Sample		
	Необработанный Untreated	Перегретый Heat-treated	Переохлажденный Freeze-thawed
ГДД, нм HDD, nm	3030	4030	3582
Стандартное отклонение, нм Standard deviation, nm	157	511	277
Относительное стандартное отклонение, % Rel. standard deviation, %	5,18	12,68	7,73

Совокупность данных показывает, что Litesizer способен измерять размер частиц вирусной вакцины с адъювантом соли алюминия. Обнаруженные частицы имеют ожидаемый для гидроксида алюминия размер. Интересно, что значительное увеличение ГДД наблюдается как для образцов вакцины, подвергнутых термической обработке, так и для образцов вакцины, подвергнутых замораживанию – размораживанию, что указывает на то, что серьезные нарушения холодной цепи способствуют агрегации адъюванта.

Измерение размера частиц образцов вакцины против вируса гриппа

Ожидаемый размер живого вируса гриппа составляет около 100 нм, но было показано, что инактивация и расщепление детергента уменьшают размер первичных частиц в препаратах вакцины¹.

Гранулометрический состав образца необработанной противогриппозной вакцины показывает бимодальное распределение, при этом основной пик достигает максимума при 250 нм, а вторичный пик – около 30 нм (рисунок 3, зеленая кривая). Таким образом, наши результаты показывают, что исследуемая вакцина состоит из расщепленных вирусных частиц диаметром около 30 нм и агрегатов большего размера.

Поскольку большие частицы вносят гораздо больший вклад в сигнал ДРС, чем более мелкие, тот факт, что крупные частицы визуальнo доминируют в распределении, не обязательно указывает на то, что

¹ Kon T.C., et al. Influenza Vaccine Manufacturing: Effect of Inactivation, Splitting and Site of Manufacturing. Comparison of Influenza Vaccine Production Processes. *PLOS One*. 2016;11:e0150700.

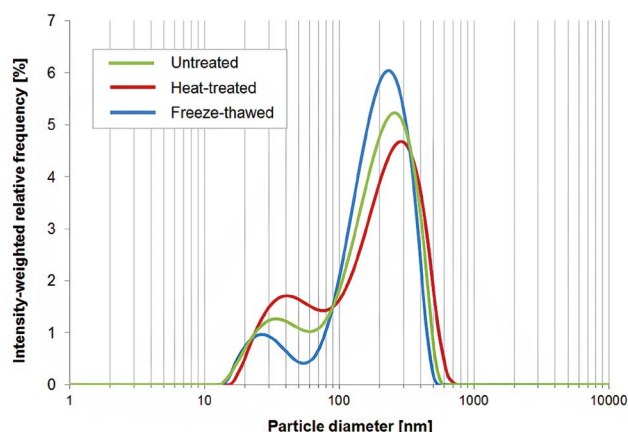


Рисунок 3. Взвешенное по интенсивности распределение частиц по размерам вакцины против вируса гриппа, хранившейся должным образом (зеленый график), перегретой (красный график) и подвергавшейся заморозке (синий график). Кривые являются усредненными по 6 последовательным измерениям

Figure 3. Intensity-weighted particle size distribution of influenza vaccine samples, either untreated (green), heat-treated (red), or freeze-thawed (blue). Curves represent the averages from 6 consecutive measurements

большая часть материала находится в агрегированной форме. Фактически, когда распределение частиц по размерам пересчитывалось с взвешенного по интенсивности на объемное или числовое, пик агрегатов исчезал, а виден оставался только вторичный пик (приблизительно 30 нм) (данные не показаны). Это указывает на то, что первичных частиц намного больше, чем агрегатов. Однако, поскольку метод DLS по своей природе взвешен по интенсивности, и поскольку характеристика агрегатов очень важна для контроля качества вакцин, мы выполнили анализ результатов исключительно на основе данных, взвешенных по интенсивности.

Площади под кривой для пика 1 (агрегаты) и пика 2 (одиночные частицы) подтверждают различия между образцами, наблюдаемые в распределении частиц по размерам. Как показано на рисунке 4, вклад единичных частиц (пик 2) в сигнал ДРС увеличивается с 16 % до 24 %, когда образец подвергается термообработке ($P < 0,01$). Напротив, единичные частицы составляют только 11 % сигнала ДРС в переохлажденном образце ($P < 0,001$).

Эти результаты показывают, что тонкие, но существенные различия в относительной пропорции единичных частиц и агрегатов могут быть эффективно обнаружены с помощью ДРС. Наши наблюдения также предполагают, что термическая обработка и замораживание-оттаивание имеют противоположные эффекты на агрегационное поведение инактивированных частиц вируса гриппа, при этом замораживание-оттаивание способствует агрегации, в то время как термическая обработка приводит к дезагрегации.

Таблица 2. Гидродинамический диаметр (в нм), пик по интенсивности (в нм) и площадь под кривой для необработанного, перегретого и переохлажденного образца вакцины против вируса гриппа

Table 2. Hydrodynamic diameter (in nm), peak by intensity (in nm) and area under the curve – Peak (in %) for untreated, heat-treated and freeze-thawed influenza vaccine samples

Параметр Parameter	Образец Sample		
	Необработанный Untreated	Перегретый Heat-treated	Переохлажденный Freeze-thawed
ГДД $\pm$ CO*, нм HDD $\pm$ SD*, nm	156 $\pm$ 2,2	151 $\pm$ 4,4	164 $\pm$ 3,3
Пик 1 по интенсивности $\pm$ CO, нм Peak 1 by Intensity $\pm$ SD, nm	231 $\pm$ 13,6	260 $\pm$ 25,5	218 $\pm$ 9,3
Пик 2 по интенсивности $\pm$ CO, нм Peak 2 by Intensity $\pm$ SD, nm	34,2 $\pm$ 3,8	42,3 $\pm$ 5,4	29,4 $\pm$ 2,6
Площадь под кривой – Пик 1 $\pm$ CO, % Area under curve – Peak 1 $\pm$ SD, %	83,7 $\pm$ 2,6	76,1 $\pm$ 3,9	89,2 $\pm$ 0,9
Площадь под кривой – Пик 2 $\pm$ CO, % Area under curve – Peak 2 $\pm$ SD, %	16,3 $\pm$ 2,6	23,9 $\pm$ 3,9	10,8 $\pm$ 0,9

Примечание. * Стандартное отклонение.

Note. * Standard deviation.

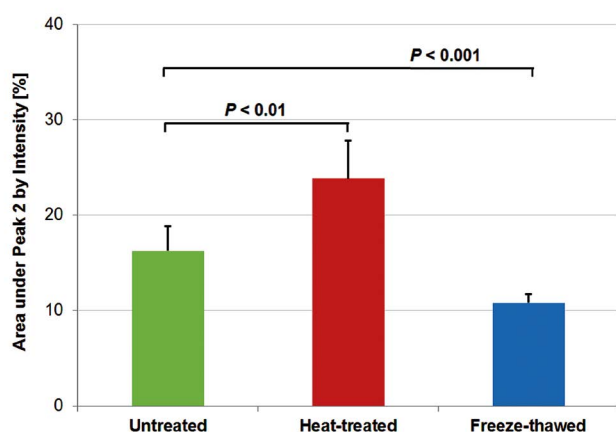


Рисунок 4. Площадь под кривой для пика 2 (единичные частицы) по интенсивности (в %) для необработанных, перегретых и переохлажденных образцов противогриппозной вакцины. Статистическая значимость между различными наборами данных, определенная стандартным t-критерием, показана в соответствующих скобках

Figure 4. Area under the curve for peak 2 (primary particles), by intensity, in %, for untreated, heat-treated and freeze-thawed influenza vaccine samples. Statistical significance between the different data sets, as determined by standard t-test, is shown on the relevant brackets

Измерение дзета-потенциала образцов вакцины от КЭ и вируса гриппа

Поверхностный заряд частиц, характеризующий их дзета-потенциалом, обычно используется как показатель коллоидной стабильности. Чем больше абсолютный дзета-потенциал, тем больше силы отталкивания между частицами и тем стабильнее будет препарат. Но в случае частиц, предназначенных для введения *in vivo*, также показано, что дзета-потенциал влияет на поглощение частиц конкретными клетками.

Известно, что отрицательные заряды ограничивают опсонизацию белков на экзосомах. В свою очередь это замедляет их выведение ретикуло-эндотелиальной системой и увеличивает время их жизни *in vivo*¹. Другие сообщения указывают на то, что катионные наночастицы преимущественно поглощаются дендритными клетками и приводят к усилению местных иммунных ответов по сравнению с их анионными аналогами². В целом это говорит о том, что измерение дзета-потенциала очень важно для контроля качества вакцинных препаратов.

В данной работе измерялся дзета-потенциал образцов вакцины от КЭ (необработанных, перегретых и переохлажденных) при помощи особой кюветы Univette и адаптера малого объема для нее, что позволило проводить измерения всего с 50 мкл образца.

Как показано на рисунке 5 и в таблице 3, дзета-потенциал частиц вакцины против клещевого энцефалита можно эффективно измерить с помощью Lite-

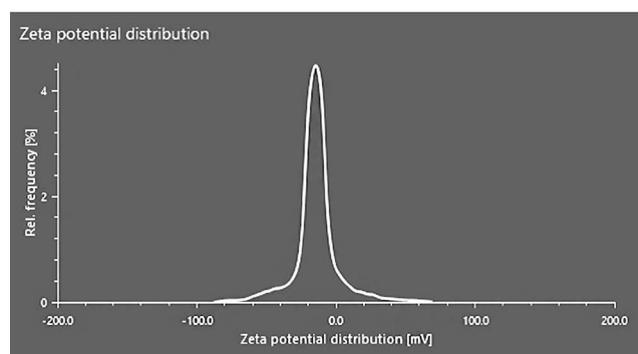


Рисунок 5. Типичное распределение дзета-потенциала для необработанного образца вакцины против клещевого энцефалита. Измерение проводилось с помощью Univette и адаптера малого объема (объем пробы = 50 мкл)

Figure 5. Representative Zeta potential distribution for an untreated TBE vaccine sample. Measurement performed with the Univette and the small volume accessory (sample volume = 50 μ L)

¹ Ren J., He W., Zheng L., Duan H. From structures to functions: insights into exosomes as promising drug delivery vehicles. *Biomaterials sciences*. 2016;4:910–921.

² Fromen C. A., et al. Nanoparticle surface charge impacts distribution, uptake and lymph node trafficking by pulmonary antigen-presenting cells. *Nanomedicine*. 2016;12:677–687.

sizer с хорошей воспроизводимостью. Средний дзета-потенциал является слабо отрицательным (около -12 мВ) и не изменяется заметно ни при термообработке, ни при замораживании-оттаивании.

Таблица 3. Результаты измерений дзета-потенциала для необработанных, перегретых и переохлажденных образцов вакцины против клещевого энцефалита. Средние результаты 5 последовательных измерений

Table 3. Zeta potential results for untreated, heat-treated and freeze-thawed TBE vaccine samples. Mean results from 5 consecutive measurements

Параметр Parameter	Образец Sample		
	Необработанный Untreated	Перегретый Heat-treated	Переохлажденный Freeze-thawed
Средний дзета-потенциал, мВ Mean ZP, mV	-12,2	-11,5	-12,0
Стандартное отклонение, мВ Standard Deviation, mV	1,3	0,3	0,2
Относительное стандартное отклонение, % Rel. standard deviation, %	10,6	2,6	1,4

Образец противогриппозной вакцины также показывает слабоотрицательные (примерно -6 мВ) значения дзета-потенциала, которые также существенно не изменяются ни после термической обработки, ни после замораживания-оттаивания (рисунок 6, таблица 4).

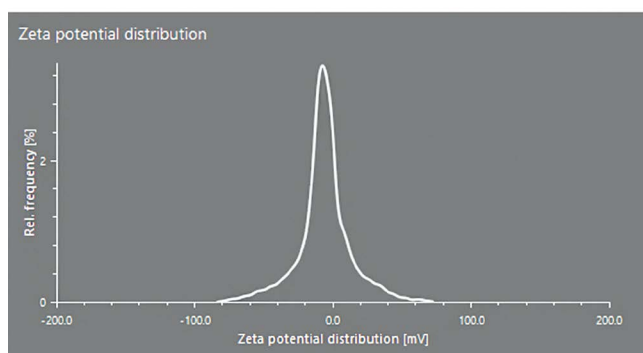


Рисунок 6. Типичное распределение дзета-потенциала для необработанного образца вакцины против гриппа. Измерение проводилось с помощью Univette и адаптера малого объема (объем пробы = 50 мкл)

Figure 6. Representative Zeta potential distribution for an untreated influenza vaccine sample. Measurement performed with the Univette and the small volume accessory (sample volume = 50 μ L)

Как показывает практика, коллоидные системы считаются стабильными, если абсолютные значения дзета-потенциала превышают 30 мВ. Таким образом, можно предположить, что низкая величина дзета-потенциала, наблюдаемая здесь для обеих вакцин, объясняет их тенденцию к агрегации в ответ на нарушения холодовой цепи.

Таблица 4. Результаты измерений дзета-потенциала для необработанных, перегретых и переохлажденных образцов вакцины против клещевого энцефалита. Средние результаты 5 последовательных измерений

Table 4. Zeta potential results for untreated, heat-treated and freeze-thawed influenza vaccine samples. Mean results from 5 consecutive measurements

Параметр Parameter	Образец Sample		
	Необработанный Untreated	Перегретый Heat-treated	Переохлажденный Freeze-thawed
Средний дзета-потенциал, мВ Mean ZP, mV	-6,6	-6,0	-5,7
Стандартное отклонение, мВ Standard Deviation, mV	0,9	0,8	1,3
Относительное стандартное отклонение, % Rel. standard deviation, %	13,7	12,5	22,4

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

И размер, и дзета-потенциал частиц важны для срока годности и иммуногенности вакцинных препаратов. Здесь мы демонстрируем, что Litesizer – это быстрый и эффективный прибор для характеристики противовирусных вакцин.

Вакцина против клещевого энцефалита с адъювантом соли алюминия, как и ожидалось по литературным данным, состоит из частиц нижнего микрометрового диапазона. В вакцине против гриппа, не содержащей адъюванта, наблюдаются как расщепленные вирусы, так и более крупные агрегаты. Показано, что для обеих вакцин моделируемые нарушения холодовой цепи (термическая обработка или замораживание-оттаивание) вызывают плавные, но значительные изменения в распределении частиц по размерам.

Также были успешно проведены измерения дзета-потенциала, демонстрирующие, что обе вакцины состоят из слабоанионных частиц. Нарушения холодовой цепи, по-видимому, не приводят к существенному изменению поверхностного заряда частиц вакцины.

Анализ частиц нажатием одной кнопки

Безграничные возможности для исследования образцов любой природы: от прозрачных и разбавленных до мутных и поглощающих

Интуитивно понятное программное обеспечение KALLIOPE

- соответствует требованиям международных регуляторов
- постоянные совершенствования и обновления

Твердотельный лазерный диод и высокочувствительная оптика

- минимум времени на стабилизацию лазера

3 угла для измерения размеров частиц

- возможность автоматического выбора угла детектирования
- особые алгоритмы для анализа полидисперсных образцов

Запатентованная технология **спPALS** для определения дзета - потенциала

- особая **Омега - кювета**, обеспечивающая улучшенную воспроизводимость
- быстрый анализ и меньшее воздействие на образец

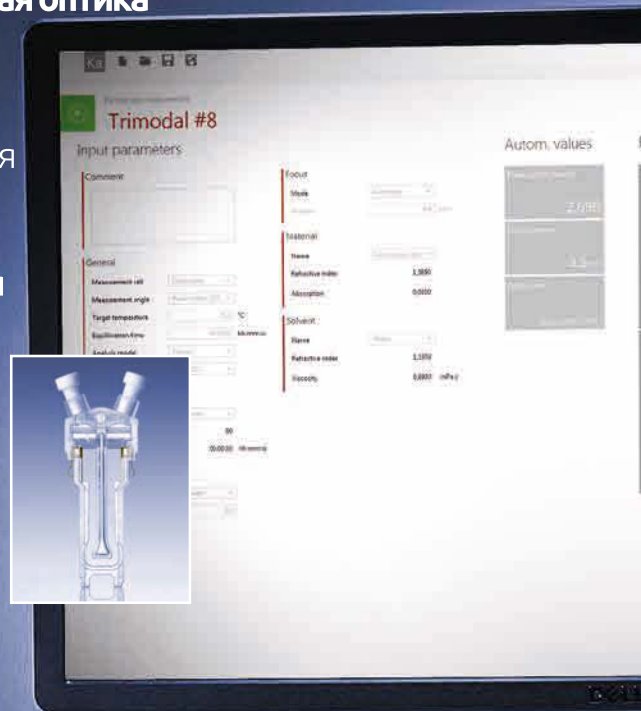
Измерение показателя преломления растворителей

Отслеживание оптического пропускания образца в реальном времени

- позволяет отследить агрегацию, осаждение



Узнать больше



Информационная статья / Informational article

II Фармацевтическая Выставка-Форум «ТехноФарм Сибирь» 2022

17–18 марта в Новосибирске состоялась выставка оборудования, сырья, материалов и услуг для производства фармацевтических препаратов, парфюмерно-косметической продукции и БАДов.

II Pharmaceutical Exhibition-Forum "TechnoPharm Siberia" 2022

On March 17–18, Novosibirsk hosted an exhibition of equipment, raw materials, materials and services for the production of pharmaceuticals, perfumes and cosmetics and dietary supplements.



Мероприятия прошло в теплой почти семейной обстановке. Организаторы форума активно поддерживали, как экспонентов, так и участников. Помимо высокой профессиональной значимости мероприятия, участникам удалось пообщаться и в неформальной обстановке, обменяться идеями, обзавестись новыми контактами, что особенно ценно в условиях, когда приходится одновременно решать множество разнотипных задач по развитию отрасли.

Экспоненты выставки единогласно отметили высокий качественный состав посетителей мероприятия. Среди участников были как новые игроки, которые только входят в отрасль, так и постоянные партнеры, сотрудничество с которыми продолжается уже несколько лет.

На протяжении двух дней работы форума производители сырья, материалов, оборудования для фармацевтики, косметики и ветеринарии обменивались знаниями, опытом и идеями развития отрасли. Посетителям выставки предоставилась возможность познакомиться с новыми для региона игроками рын-

ка, принять участие в дискуссиях и обсудить волнующие вопросы в рамках деловой программы Форума.

В экспозиции выставки приняли участие 22 компании из фармацевтической отрасли России. Заявили участие 57 компаний, но в связи с текущей геополитической обстановкой в мире многие вынуждены были отказаться от участия в этом году. Основные участники выставки – это компании, которые заинтересованы в продолжении сотрудничества без оглядки на обстоятельства.

Основу экспозиции выставки составили:

- ЛабТэк (**Beckman Coulter**).
- ТехноФарм.
- ADK Cosmetics.
- Медиана-Фильтр НПК.
- ГК Фармтех.
- Альфа-техно.
- Физлабприбор.
- Синофармтех / SinoPharmtech.
- ГК Гарант.
- ГК Промышленные покрытия.
- Медтех ТД.



- Компания МИЛЛАБ.
- Tofflon.
- Поло Хандельс АГ.
- BIOGRUND.
- ИХТТМ СО РАН.
- Pharmatika.
- Альгимед.
- Альфа-Сибирь.
- Септико.

«ТехноФарм Сибирь» 2022 продемонстрировала всю цепочку игроков фармацевтической промышленности, от производителей оборудования, сырья и расходных материалов до компаний, предоставляющих услуги по контрактному производству, сертификации продукции, логистике и распространению препаратов.

Официальным партнером выставки-форума «ТехноФарм Сибирь» 2022 стала компания «ЛабТэк» – официальный дистрибьютор компании **Beckman Coulter**, одного из мировых лидеров по производству аналитического оборудования для биомедицинских лабораторий, а также исследовательских и лабораторий контроля качества на производствах.

В этом году Форум отличался особой важностью, ведь развитие фармацевтической отрасли в России сегодня, как никогда актуально.

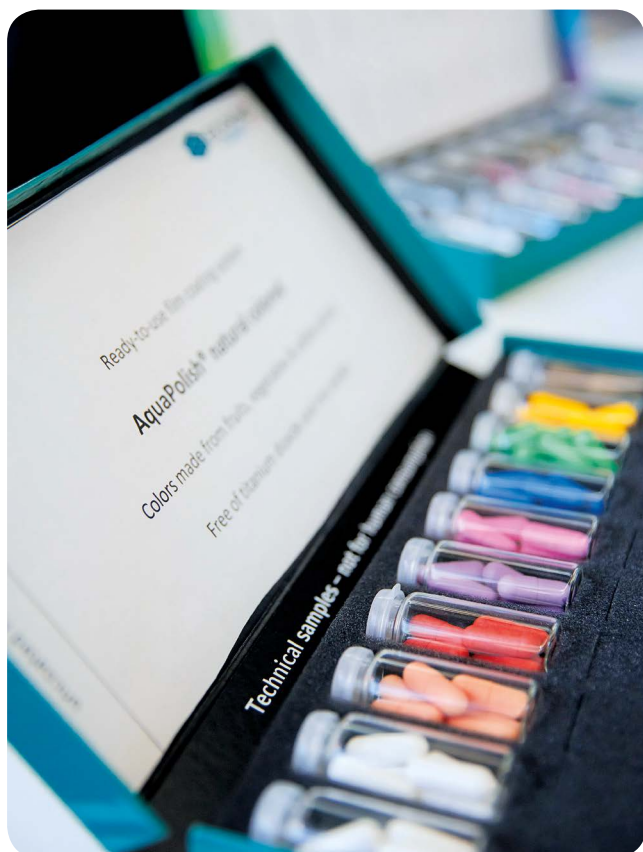
В рамках выставки был проведен семинар по проектированию производства, основам GMP, анализу рисков и технологии чистоты, другим актуальным вопросам. По окончании курса участники получили сертификаты качества от Ассоциации инженеров по контролю микрозагрязнений (Асинком).

Главным спикером Форума был **Александр Евгеньевич Федотов**, доктор технических наук, президент АСИНКОМ, председатель ТК 184 «Обеспечение промышленной чистоты» (Росстандарт).

«ТехноФарм Сибирь» 2022 в цифрах:

- 22 участвующих компании.
- Более 600 человек посетителей за 2 дня работы выставки-форума.
- 40 человек получили сертификаты качества от Асинком.

«ТехноФарм Сибирь» 2022 – это возможность поддерживать контакты с партнерами и оставаться в курсе развития отрасли в течение всего года!



Информационная статья / Informational article

«Аналитика Экспо 2022»: 121 участник, 20-й юбилей и новинки

С 19 по 22 апреля в МВЦ «Крокус Экспо» состоялась 20-я юбилейная Международная выставка лабораторного оборудования и химических реактивов «Аналитика Экспо 2022».

Analytics Expo 2022: 121 participants, 20th anniversary and novelties

From April 19 to April 22, the 20th Anniversary International Exhibition of Laboratory Equipment and Chemical Reagents "Analitika Expo 2022" was held at the Crocus Expo IEC.



Выставка «Аналитика Экспо 2022» стала уникальной площадкой, на которой собрались производители и поставщики лабораторного оборудования, представители научно-исследовательских лабораторий и другие специалисты отрасли для заключения выгодных соглашений, ознакомления с новинками и обсуждения актуальных вопросов. В 2022 году участниками стали 121 компания из России, Белоруссии, Великобритании, Германии, Дании, Индии, Испании, Китая, США, Франции, Швейцарии и Японии. Выставку посетили 4 895 специалистов.

Выставка «Аналитика Экспо 2022» отметила 20-й юбилей и из года в год демонстрирует свою значимость для российской аналитической химии. Именно это направление науки занимается совершенствованием существующих и разработкой новых методов анализа, что позволяет решать задачи во многих отраслях.

Благодарственные письма за поддержку и многолетний вклад в развитие научно-деловой программы выставки получили эксперты: заместитель генерального директора ООО «Надлежащая экспертиза» **Сергей Крейнин**, директор Ассоциации «Росхимреактив» **Ирина Вендило**, советник РАН **Юрий Золотов**, заместитель председателя Научного совета по аналитической химии РАН **Григорий Цизин**, ученый секретарь НСАХ РАН **Ирина Киселева** и коллектив ААЦ «Аналитика».

Дипломы за многолетнее участие в выставке были вручены компаниям: Waters, «Биохиммак», «Вибра рус», «Диаэм», «Катроса Реактив», «Лабтест», «Люмэкс», «Мелитэк», «Мерк», «Миллаб», «Неохром», «Соктрейд», «Спектр ОКБ», «Химмед», «Хроматэк», «Хромос Инжиниринг», «Шелтек», «Экротхим», «Энерголаб» и «Эпак-Сервис».

Новинки участников

Компания «Р-АСА» представила мощный энерго-дисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр второго поколения Rigaku NEX CG II, который обеспечивает быстрое качественное и количественное определение основных и второстепенных элементов в широком спектре типов образцов.

ГК «Крисмас» продемонстрировала на выставке одну из модификаций настольной лаборатории анализа воды серии НКВ-12. В серию входит 8 лабораторий, каждая из которых создана специально для решения конкретных аналитических задач. Лаборатории позволяют проводить определение по 29 показателям.

Компания «ВИБРОТЕХНИК» представила виброприводы и сита всех распространенных типоразмеров, что обеспечивает их совместимость с оборудованием ведущих мировых производителей и позволяет заказчикам осуществлять эффективное импортозамещение.

Компания «Лабораторное Оборудование и Приборы» анонсировала новую линейку вытяжных шкафов, для которой были разработаны запатентованные алюминиевые профили. Внутреннее наполнение рабочих камер закрывает все потребности химиков. Тумбы имеют возможность подключения к централизованной вытяжке.

На стенде компании «ХРОМОС Инжиниринг» был представлен газовый хромато-масс-спектрометр «Хромос», который применяется в нефтегазовой, химической, пищевой промышленности, атомной энергетике, сельском хозяйстве и экологии.



Деловая программа

Выставка сопровождалась четырехдневной деловой программой, состоящей из 13 тематических мероприятий. Более 80 спикеров обсудили текущую ситуацию в области аналитической химии, дали рекомендации по развитию лабораторий в условиях санкций и поделились новыми разработками. В этом году особое внимание было уделено вопросам регуляторики и оформления документов, лабораторному дизайну, российским инновационным материалам и решениям.

На кейс-сессии «Проектирование и обустройство безопасной лаборатории» эксперты рассказали о создании исследовательской лаборатории в уже построенном здании, организации безопасного рабочего пространства и систем вентиляции лабораторных помещений, а также об инструментах обеспечения безопасных условий труда.

Во время проведения круглого стола «Обеспечение работы аналитических и испытательных лабораторий в условиях санкций» были выявлены возможные риски в области технического регулирования, стандартизации, оценки соответствия и метрологии для российской промышленности и бизнеса в условиях санкций. Эксперты выдвинули предложения по преодолению ограничений.

На сессии «Ведение записей в аналитических лабораториях. Требования стандарта ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 в части ведения записей» **Иван Болдырев**, исполнительный директор ААЦ «Аналитика», рассказал о пяти составляющих отчета о верификации: формулировке измеряемой величины, спецификации методики, основах для сравнения прослеживаемых характеристик, калибровке, стандартных образцах и аттестованных смесях.

Семинар «Современные масс-спектрометрические методы для биомедицинских исследований» открыла **Наталья Ломова**. Она рассказала об изменении аминокислотного профиля в системе мать-плод при Covid-19. **Евгений Николаев**, представитель «Сколтех», рассказал об истории и современных возможностях масс-спектрометрии, методе анализа веществ, при котором измеряется отношение массы к заряду ионизированных атомов, молекул и их фрагментов.



На сессии «Изменения в законодательстве в сфере аккредитации» спикеры обсудили нюансы законодательства и практические советы по общению с экспертами, принимающими решение о продлении документов.

Награждение участников

22 апреля состоялась торжественная церемония награждения участников выставки «Аналитика Экспо 2022»:

- **Компания «Петротех»** – «За стенд, привлекающий наибольшее внимание посетителей».
- **Компания Qualitest** – «За активную работу персонала на выставке».
- **Компания «Праймкемикалсгрупп»** – «За отлично продуманное расположение экспонатов на стенде».
- **Компания «Хроматэк СКБ»** – «За эффективные визуальные коммуникации».
- **Компания «Химмед»** – «За наибольшее количество привлеченных посетителей на выставку при помощи промокода».

Марина Челак, директор выставки «Аналитика Экспо»: «Выражаю огромную благодарность всем участникам и посетителям выставки. Представителям профессиональных сообществ сейчас крайне важно объединяться, консолидировать усилия по сохранению и укреплению российской науки и производства. От всего сердца благодарю участников, которые представили свои стенды на выставке. Экспозиция получилась яркой, интересной, насыщенной. В этом году было представлено много российских компаний, прошли презентации инновационных разработок, на деловой программе мы говорили об участии государства в развитии лабораторий и о наших возможностях по поддержке друг друга. Выставка «Аналитика Экспо» всегда была местом, где специалисты имеют возможность узнать последние новости отрасли, пообщаться, обменяться опытом. Отдельно благодарим всех наших многолетних партнеров, которых мы отметили памятными дипломами на награждении в честь юбилея выставки. Будем рады увидеться в 2023 году».

Партнеры

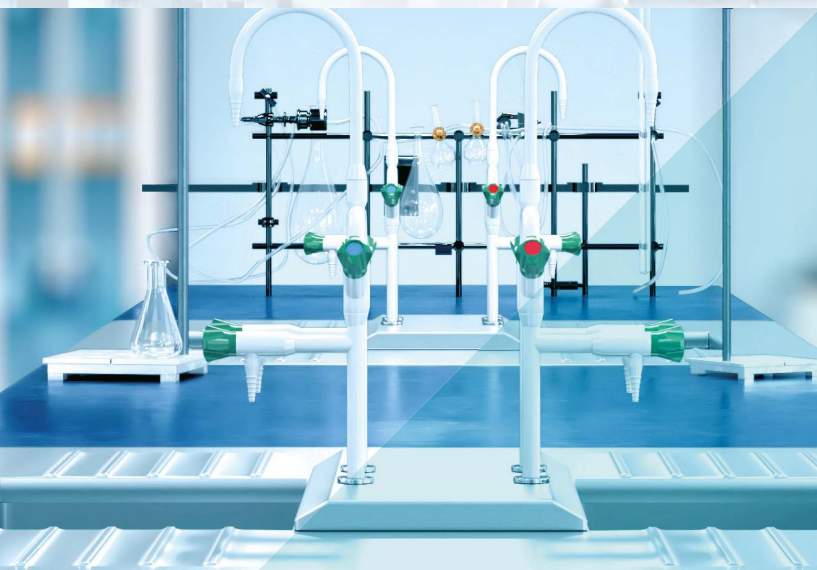
Спонсор регистрации и навигации – «Энерголаб».
Информационный партнер – телеканал «МИР».



21-я Международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

11–14.04.2023

Москва, Крокус Экспо



Забронируйте стенд
analitikaexpo.com



ОРГАНИЗАТОР
ORGANISER



<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-38-45>
УДК 544.165



Оригинальная статья / Research article

Зависимость антимикробных эффектов гуанидинсодержащих производных пектина от некоторых структурных характеристик

О. Р. Ахмедов¹✉, Ш. А. Шомуротов¹, А. С. Тураев¹, А. В. Сидоренко²

¹ Институт Биоорганической химии Академии Наук Республики Узбекистан, 100125, Узбекистан, г. Ташкент, Мирзо Улугбека, д. 83

² Государственное научное учреждение «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси», 220141, Беларусь, г. Минск, ул. Академика Купревича, д. 2

✉ Контактное лицо: Ахмедов Олий Равшанович. E-mail: akhmedov.oliy@gmail.com

ORCID: О. Р. Ахмедов – <https://orcid.org/0000-0002-0056-8646>; Ш. А. Шомуротов – <https://orcid.org/0000-0002-3890-0026>; А. С. Тураев – <https://orcid.org/0000-0003-2915-9237>; А. В. Сидоренко – <https://orcid.org/0000-0001-8447-9538>.

Статья поступила: 23.09.2021

Статья принята в печать: 12.01.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. К настоящему времени практически отсутствуют данные о взаимосвязи между биологической активностью и структурными характеристиками антимикробных полимеров, синтезируемых путем химического присоединения гуанидиновых групп к макромолекулам полисахаридов. В связи с этим обстоятельством, представляется интересным осуществление химической модификации гуанидина природными полимерами в частности полиальдегидпектином и проведение сравнительных исследований антимикробной активности полученных образцов, имеющих различные физико-химические характеристики.

Цель. Синтез гуанидинсодержащих производных пектина и установление влияния структурных вариаций, полученных образцов на проявления антимикробных свойств.

Материалы и методы. Синтез гуанидинсодержащих производных пектина состоял из следующих стадий: периодатное окисление полисахарида, модификация гуанидина посредством полиальдегидпектина и химическое восстановление азометинных связей. Количество гуанидина в полученных образцах вычислено ацидиметрическим титрованием, содержание азота (N, %) определено с помощью элементного анализатора марки Eura EA (Italy). Значения рКа синтезированных соединений найдены методом обратного титрования. Спектры поглощения были сняты на спектрофотометре «UV 1280» (Shimadzu, Japan), в диапазоне $\lambda = 180-400$ нм. ИК-спектры записывали на спектрометре Vector-22 в области длин волн $400-4000$ см⁻¹ в таблетках KBr (3 мг образца / 300 мг KBr). Молекулярно-массовые характеристики синтезированных производных, определяли методом высокоэффективной гелепроникающей хроматографии на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity. Острая токсичность гуанидинсодержащих производных пектина определена методом Прозоровского. Сравнительная оценка антимикробной активности проводилась методом диффузии в агар.

Результаты и обсуждение. Варьируя степень окисления полиальдегидпектина, синтезированы соединения, отличающиеся степенью замещения, содержанием гуанидина, молекулярной массой и значением рКа. Установлено, что выраженность антибактериальной и противогрибковой активности исследованных образцов зависит от степени замещения и природы противоиона. С увеличением количественного содержания гуанидиновых групп в макромолекулярной цепи пектина, возрастает противомикробное действие. Обнаружено, что замена низкомолекулярных Cl⁻, NO₃⁻, F⁻, I⁻ противоионов на карбоксилат-анионы приводит к резкому уменьшению антимикробных свойств. При пероральном введении синтезированных соединений мышам установлено, что все образцы относятся к разряду практически не токсичных веществ (V-й класс).

Заключение. Сравнительный анализ гуанидинсодержащих производных пектина с различными характеристиками показал, что выраженность антимикробного действия синтезированных соединений в отношении бактерий и грибов рода *Candida* зависит от количественного содержания катионных группировок и природы противоиона.

Ключевые слова: гуанидин, полиальдегидпектин, химическая модификация, антимикробные свойства, острая токсичность

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

Вклад авторов. О. Р. Ахмедов и Ш. А. Шомуротов разработали метод химической модификации гуанидина полиальдегидпектином. Исследовали структуру, состав и молекулярные характеристики синтезированных соединений, принимали непосредственное участие в написании и корректуре статьи. А. С. Тураев осуществлял научно-теоретическое управление исследованием и рецензирование статьи. А. В. Сидоренко исследовала антимикробные свойства гуанидинсодержащих производных пектина с различными физико-химическими характеристиками. Данная статья была написана и согласована при участии всех авторов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Инновационного развития Республики Узбекистан (проект № MRB-2021-539).

Для цитирования: Ахмедов О. Р., Шомуротов Ш. А., Тураев А. С., Сидоренко А. В. Зависимость антимикробных эффектов гуанидинсодержащих производных пектина от некоторых структурных характеристик. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):38–45. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-38-45>

Dependence of Antimicrobial Effects of Guanidine-containing Pectin Derivatives from Some Structural Characteristics

Oliy R. Akhmedov¹✉, Shavkat A. Shomurotov¹, Abbaskhan S. Turaev¹, Anastasiya V. Sidarenka²

¹ Institute of Bioorganic Chemistry of the Uzbek Academy of Sciences, 83, Mirzo Ulugbek str., Tashkent, 100125, Uzbekistan

² Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, 2, Akademika Kuprevich str., Minsk, 220141, Belarus

✉ Corresponding author: Oliy R. Akhmedov. E-mail: akhmedov.oliy@gmail.com

© Ахмедов О. Р., Шомуротов Ш. А., Тураев А. С., Сидоренко А. В., 2022

© Akhmedov O. R., Shomurotov Sh. A., Turaev A. S., Sidarenka A. V., 2022

ORCID: Oliy R. Akhmedov – <https://orcid.org/0000-0002-0056-8646>; Shavkat A. Shomurotov – <https://orcid.org/0000-0002-3890-0026>;
Abbaskhan S. Turaev – <https://orcid.org/0000-0003-2915-9237>; Anastasiya V. Sidarenka – <https://orcid.org/0000-0001-8447-9538>.

Received: 23.09.2021

Revised: 12.01.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. Up to the present time, there are practically no studies on the relationship between the structural characteristics and biological activity of antimicrobial polymers synthesized by the chemical addition of guanidine groups to polysaccharide macromolecules. Therefore, there is a need to carry out the chemical modification of guanidine with natural polymers, in particular polyaldehyde pectin, and to conduct comparative studies of the antimicrobial activity of the obtained samples with different physicochemical characteristics.

Aim. To conduct the synthesis of guanidine-containing pectin derivatives. In addition, to determine the influence of structural variations in the obtained samples on exhibiting antimicrobial properties.

Materials and methods. The synthesis of guanidine-containing pectin derivatives consisted of the following stages: periodate oxidation of the polysaccharide, modification of guanidine using polyaldehyde pectin, and chemical reduction of azomethine bonds. The amount of guanidine in the obtained samples was calculated by acidimetric titration, the nitrogen content (N, %) was determined using a Eura EA (Italy) elemental analyzer. The pKa values of the synthesized compounds were found by the back titration method. Absorption spectra were analyzed on a "UV 1280" spectrophotometer (Shimadzu, Japan) in the range $\lambda = 180\text{--}400\text{ nm}$. IR spectra were recorded on a Vector-22 spectrometer in the wavelength range of $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ in KBr tablets (3 mg sample / 300 mg KBr). The molecular weight characteristics of the synthesized derivatives were determined by high-performance gel permeation chromatography on an Agilent 1260 Infinity liquid chromatograph. The acute toxicity of guanidine-containing pectin derivatives was calculated by the Prozorovsky method. Comparative assessment of antimicrobial activity was conducted by agar diffusion method.

Results and discussion. By varying the oxidation level of polyaldehyde pectin, synthesized compounds differ in the degree of substitution, guanidine content, molecular weight, and pKa value. It was found that the levels of the antibacterial and antifungal activity of the studied samples depend on the degree of substitution and the nature of the counterion. The antimicrobial effect increases with an increase in the quantitative content of guanidine groups in the macromolecular chain of pectin. Moreover, it was found that the change of low molecular weight Cl^- , NO_3^- , F^- , I^- counterions by carboxylate anions leads to a sharp decrease in antimicrobial properties. Upon oral injection of the synthesized compounds to mice, it was found that all samples belong to the category of practically non-toxic substances (V-class).

Conclusion. Comparative analysis of guanidine-containing pectin derivatives with different characteristics showed that the severity of the antimicrobial action of the synthesized compounds against bacteria and fungi of the genus *Candida* depends on the quantitative content of cationic groups and the nature of the counterion.

Keywords: guanidine, polyaldehyde pectin, chemical modification, antimicrobial properties, acute toxicity

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. Oliy R. Akhmedov and Shavkat A. Shomurotov developed a method for the chemical modification of guanidine with polyaldehyde pectin. In addition, studied the structure, composition and molecular characteristics, as well as took a direct part in writing and correcting the article. Abbaskhan S. Turaev carried out scientific and theoretical research management and review of the article. Anastasiya V. Sidarenka studied the antimicrobial properties of guanidine-containing pectin derivatives with different physicochemical characteristics. This article was written and agreed upon with the participation of all authors.

Funding. This work was financially supported by the Ministry of Innovative Development of the Republic of Uzbekistan (project No. MRB-2021-539).

For citation: Akhmedov O. R., Shomurotov Sh. A., Turaev A. S., Sidarenka A. V. Dependence of antimicrobial effects of guanidine-containing pectin derivatives from some structural characteristics. *Drug development & registration*. 2022;11(2):38–45. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-38-45>

ВВЕДЕНИЕ

По причине резкого возрастания устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к низкомолекулярным антимикробным препаратам, применяющимся в клинической практике, усиленно ведется поиск, направленный на создание нового поколения терапевтических средств, отличающихся не только величиной биологической активности, но и улучшенными фармако-токсикологическими свойствами [1]. В этом направлении наиболее перспективными средствами можно считать антимикробные полимеры, синтез которых осуществляется различными путями. Известно, что при молекулярном конструировании макромолекулярной цепи полимера, удается в же-

лаемом направлении регулировать его биологическую активность, токсичность, фармакокинетические свойства и ряд других фармакологических характеристик, что не является возможным при химической модификации низкомолекулярных химиотерапевтических агентов [2–4].

Среди неоднородного класса антимикробных полимеров существенная роль отводится синтезу макромолекулярных производных, несущих в цепи положительный заряд. Это связано с тем, что большинство катионных полимеров обладают выраженными антимикробными свойствами, основой действия которых, является взаимодействие с отрицательно заряженной поверхностью микроорганизмов и ее последу-

ющее разрушение [5–7]. В частности, такими свойствами обладают сополимеры, по большей части синтезируемые на основе различных алифатических диаминов и гуанидина. Наличие гуанидиновых фрагментов в повторяющихся звеньях полимера придает всей макромолекуле свойства поликатионов и обеспечивает выраженное противомикробное действие [8–10]. Помимо высокого биоцидного действия полимерные производные гуанидина нетоксичны, безопасны, имеют пролонгированное действие и хорошо растворяются в воде. Перечисленные преимущества этого класса антимикробных полимеров определяют их широкое применение в качестве безвредных дезинфицирующих и антисептических средств.

Несмотря на имеющийся огромный материал в области разработки и применения полиалкиленгуанидиновых средств, к настоящему времени недостаточно сведений о работах, посвященных синтезу и фармакологическим исследованиям антимикробных полимеров, получаемых посредством химического связывания гуанидина с макромолекулами полисахаридов. Также, не изучены структурные показатели, влияющие на биологическую активность и токсикологические свойства гуанидинсодержащих производных полисахаридов. Поскольку очевидно, что после модификации гуанидина полисахаридами, эффективность биологического действия создаваемых полимерных молекул может оказаться различной и главным образом зависеть от количественного содержания катионных группировок, молекулярных характеристик, состава, природы противоиона и др.

С учетом высокой нуклеофильности аминогрупп гуанидина, способных в мягких условиях синтеза вступать в реакцию конденсации с альдегидами [11, 12], наиболее подходящим выглядит проведение химической модификации низкомолекулярного катионного фрагмента с помощью окисленного полисахарида (полиальдегида). Известно, что полиальдегиды различных полисахаридов благодаря комплексу уникальных свойств считаются практически идеальными носителями лекарственных препаратов, в связи с чем довольно часто применяются для создания физиологически активных полимеров прививочного типа [13–15].

Целью настоящей работы был синтез гуанидинсодержащих производных пектина с различными физико-химическими характеристиками и установление влияния структурных вариаций, полученных образцов на проявление антимикробных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован коммерческий цитрусовый пектин, выделенный из кожуры цитрусовых (Sigma-Aldrich, США), со степенью этерификации 65 % и молекулярной массой 160 ± 2 кДа; гуанидин углекислый квалификации х.ч.; бор гидрид натрия (Sigma-Aldrich, США) – белый кристаллический порошок с массовой

долей основного вещества ≥ 99 %; натрий йоднокислый мета (ТУ 6-09-02-54-74) квалификации ч.д.а.

УФ-спектры водных растворов образцов были сняты на спектрофотометре UV-1280 (Shimadzu, Япония), в диапазоне $\lambda = 180–400$ нм. ИК-спектры записывали на спектрометре Vector 22 в области длин волн $400–4000$ см^{-1} в таблетках KBr (3 мг образца / 300 мг KBr). Молекулярно-массовые характеристики синтезированных производных определяли методом высокоэффективной гельпроникающей хроматографии на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity. Контроль процесса анализа осуществляли с помощью рефрактометрического детектора с использованием хроматографической колонки PL aquagel-ОН MIXED длиной 300 мм и внутренним диаметром 7,5 мм (Waters, США). В качестве элюента использовали 0,1 н водный раствор нитрата натрия. Объемная скорость потока элюента составляла 0,8 мл/мин.

Содержание азота (N, %) в образцах определяли на элементном анализаторе марки Eura EA (Italy). Затем по содержанию азота вычисляли степень замещения (СЗ) каждого образца. Количество гуанидина в синтезированных соединениях найдено методом ацидиметрического титрования.

Значения рКа в конечных продуктах реакции вычисляли следующим образом: 50 мг образца растворяли в воде, затем к образовавшемуся раствору добавляли 0,1 н HCl и доводили pH до 3. После этого при постоянном перемешивании проводили титрование, добавляя аликвоты 0,1 н раствора NaOH. Величину pH раствора контролировали с помощью pH-метра (SevenCompact S220-Basic, Mettler Toledo, Германия). Значение рКа устанавливали по величине pH, при котором находилась середина плато на кривой титрования, как описано в работе [16].

Периодатное окисление пектина. На начальном этапе требовалось получение полиальдегидпектина с различной степенью окисления. Для этого в склянку из темного стекла емкостью 500 мл помещали 0,01 моль пектина, приливали 200 мл ацетатного буфера с pH 4,25 и оставляли перемешиваться до полного растворения полисахарида. Далее добавляли 0,2 н раствора NaIO_4 при молярном соотношении пектин: $\text{IO}_4^- = 1:1,5$. Процесс периодатного окисления пектина продолжался 1–5 ч, при температуре 20 °С. По окончании реакции периодатного окисления продукты осаждали ацетоном. Выпавшие осадки собирали на фильтре Шотта, промывали 70 % этиловым спиртом до отрицательной реакции на ионы IO_4^- и IO_3^- (контроль по реакции с раствором азотнокислого серебра) и сушили в темноте под вакуумом над P_2O_5 . Степень окисления ($\gamma_{\text{ок}}$) функционализированного пектина, вычисленная методом обратного йодометрического титрования [17], составила 18–47 моль%.

Химическая модификация гуанидина полиальдегидпектином. Взаимодействие окисленного пектина с гуанидином проводили в водной среде по методике, которая состояла в следующем. В стакан объ-

емом 500 мл, помещали 0,01 моль функционализированного пектина с различной степенью окисления, затем добавляли 100–200 мл воды, после полного растворения активированного полисахарида, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке, вливали раствор, содержащий 0,35 моль $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{NH} \times 1/2 \text{H}_2\text{CO}_3$. Реакция протекала при 20 °С, значении pH 8,8–9,0 и в течение 2 часов. Стабилизация азометиновых связей ($-\text{C}=\text{N}-$) проводилась боргидридом натрия. Восстанавливающего реагента брали в 2-кратном мольном избытке в расчете на 1 моль гуанидинсодержащего элементарного звена пектина. Химическая трансформация азометиновых связей в аминные связи продолжалась 10 ч, при $t = 20^\circ\text{C}$ и постоянном перемешивании. В конце добавляли 0,5 М раствор HCl (или HNO_3 , HI, HF, CH_3COOH , $\text{CH}_2\text{OH}-(\text{CHOH})_4-\text{COOH}$) и доводили pH раствора до 6,5–6,8. Полученный раствор диализовали против дистиллированной воды в течение 24 часов (с трехкратной сменной диализной воды). Диализат подвергали сублимационной сушке.

Исследование острой токсичности. Острую токсичность гуанидинсодержащих производных пектина исследовали согласно «Методическим указаниям по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [18]. Расчет однократной полулетальной дозы (LD_{50}) при пероральном введении проводили на мышах по экспресс-методу Прозоровского. Для постановки эксперимента было использовано 150 беспородных белых мышей самцов массой тела 19–22 г в возрасте 10–12 недель к моменту введения исследуемых образцов. Мышей выдерживали на карантине в течение 14 дней до проведения эксперимента. Состояние мышей оценивали в течение первого часа, а также через 1, 3, 7 и 14 суток после введения. У экспериментальных мышей регистрировали такие показатели как поведение, дыхание, состояние слизистых покровов, изменение массы тела, характер фекалий, потребление пищи и воды.

Определение антимикробной активности гуанидинсодержащих производных пектина в условиях *in vitro*. В качестве тестовых культур для определения антимикробной активности гуанидинсодержащих производных пектина нами были выбраны следующие микроорганизмы: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*. Антимикробное действие синтезированных соединений исследовано при концентрации 200 мкг/мл, методом диффузии в агар, основанном на способности изучаемых веществ диффундировать в питательную среду, на которую производится высеивание тест-культур, и подавлять рост микроорганизмов (мм). Диаметр зон задержки роста микроорганизмов меньше 10 мм оценивали, как отсутствие антимикробной активности, 10–15 мм – слабая активность, 15–20 мм – умеренно выраженная активность, свыше 20 мм – выраженная активность. Каждый образец испытывался в трех параллельных опытах. Полученные данные обрабатывали статистически с учетом критерия Стьюдента [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанный метод химической модификации гуанидина полиальдегидпектином интересен тем, что при одинаковых условиях реакции, но различной степени окисления полисахарида удается фиксировать в полимерную цепь заданное количество катионных фрагментов и тем самым оказывать влияние на характеристики конечных продуктов. Как видно из ниже представленной таблицы 1, степень замещения образцов составляет 30–90 моль%, содержание гуанидина 8,0–24,7 %, значение pK_a 8,2–9,2 $\pm 0,1$ и молекулярная масса 26 000–10 000 Да. Эти данные доказывают возможность получения катионного пектина с различной молекулярной массой, составом и содержанием физиологически активных азотсодержащих группировок.

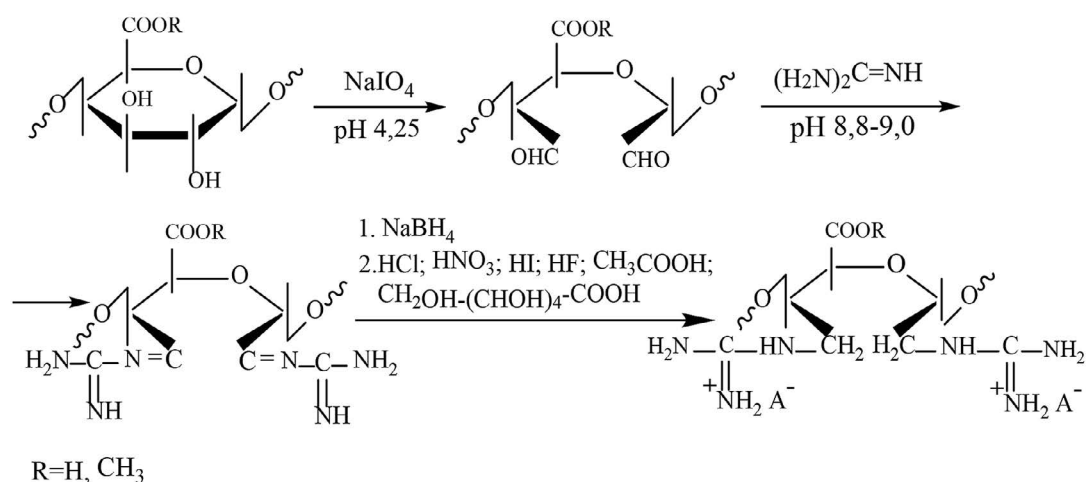


Рисунок 1. Общая схема синтеза гуанидинсодержащих производных пектина

Figure 1. General scheme for the synthesis of guanidine-containing pectin derivatives

Таблица 1. Основные характеристики синтезированных образцов

Table 1. Main characteristics of synthesized samples

У _{ок} ПАП, моль% У _{ок} РАР, mol%	Содержание азота, % Nitrogen content, %	Степень замещения, моль% Degree of substitution, mol%	Содержание гуанидина, % Guanidine content, %	Значение рКа pKa value	[η]*, дЛ/г [η]*, dL/g	М*, Да M*, Da
18	6,5	30	8,0	8,2 ± 0,1	0,23	26 000
26	9,2	44	11,8	8,5 ± 0,1	0,20	21 000
35	12,1	60	16,2	8,8 ± 0,1	0,15	15 000
42	15,3	78	21,5	9,0 ± 0,1	0,13	13 000
47	16,8	90	24,7	9,2 ± 0,1	0,09	10 000

Примечание. [η]* – характеристическая вязкость образцов, вычислена в 0.1 н растворе ацетата натрия в воде при 25 °С; М – молекулярная масса.

Note. [η]* – intrinsic viscosity of the samples, calculated in a 0.1 N solution of sodium acetate in water at 25 °C; M – molecular weight.

Присутствие гуанидина в структуре пектина подтверждено методом УФ-спектроскопии. В водных растворах гуанидина и его полимерной формы наблюдалась интенсивная полоса поглощения в области $\lambda_{\max} = 195$ нм, что доказывало наличие гуанидиновых фрагментов в полученных соединениях.

В ИК-спектре продуктов реакции присутствовали полосы поглощения в области 3400–3390 см⁻¹ ν(OH), 3270–3250 см⁻¹ (—NH₂), 2945–2930 см⁻¹ ν(CH), 1610–

1650 см⁻¹ (—C=O), 1550–1570 см⁻¹ (—NH—), 1410–1425 см⁻¹ δ_{as}(—OCH₃).

При проведении токсикологических исследований было установлено, что значение ЛД₅₀ для всех синтезированных соединений составляет порядка 3000–3700 мг/кг. Эти результаты позволяют отнести их к разряду практически не токсичных веществ (V-й класс).

В некоторых исследованиях [20, 21] доказано, что величина антимикробного эффекта катионных макромолекул зависит от количественного содержания положительно заряженных группировок, точнее общего заряда синтезированного полимера. Исходя из этих сведений, первоначально требовалось провести сравнительное исследование образцов с различной степенью замещения и соответственно значением рКа.

Представленные на рисунке 2 результаты микробиологических исследований подтверждают гипотезу о различном уровне антимикробной активности синтезированных соединений. Видно, что зона задержки роста микробных культур коррелирует со степенью замещения образцов. Так, например, образец со степенью замещения 30 моль% обладает наименьшим противомикробным действием в отношении патогенных культур. С увеличением количественного содержания гуанидиновых группировок закономерно начинает возрастать выраженность антимикробного действия. Здесь можно увидеть, что для образца с предельным содержанием гуанидиновых групп

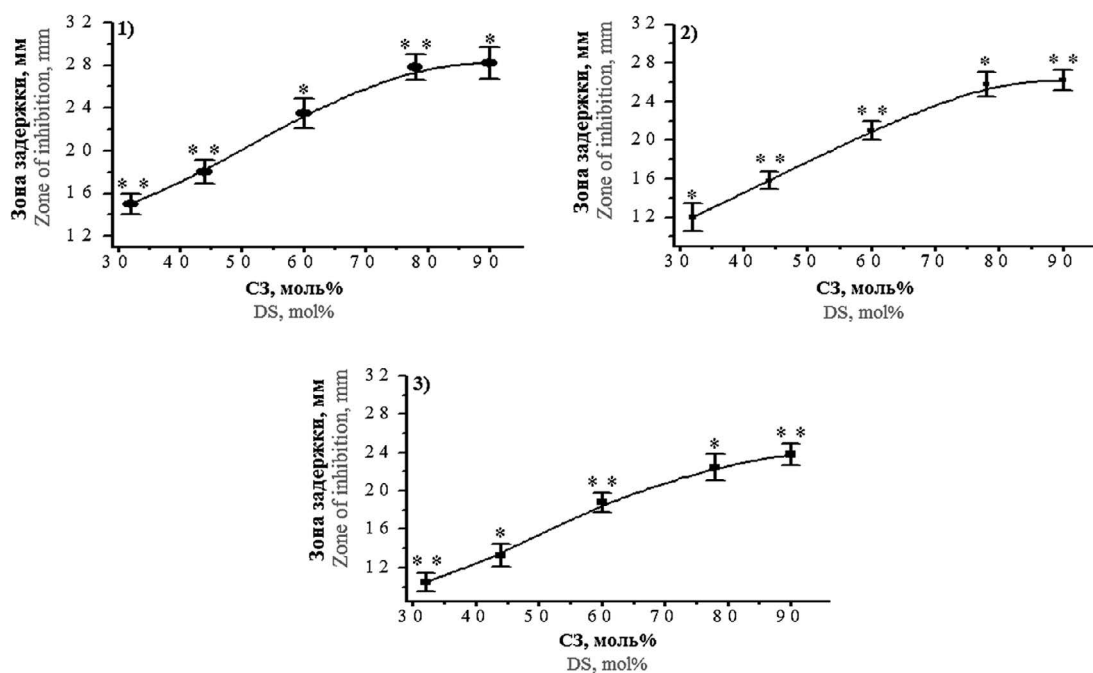


Рисунок 2. Влияние содержания гуанидиновых группировок в образцах (в виде гидрохлоридов) на антимикробную активность. 1 – *S. aureus*; 2 – *P. aeruginosa*; 3 – *C. albicans* (*p < 0.05, **p < 0.01; n = 3–4)

Figure 2. Influence of the content of guanidine groups in samples (in the form of hydrochlorides) on antimicrobial activity. 1 – *S. aureus*; 2 – *P. aeruginosa*; 3 – *C. albicans* (*p < 0.05, **p < 0.01; n = 3–4)

(90 моль%) зона задержки роста в отношении *S. aureus* составляет $28 \pm 1,6$ мм, *P. aeruginosa* $26 \pm 1,2$ мм и *C. albicans* $23 \pm 1,6$ мм соответственно.

Нужно также добавить, что низкомолекулярный гуанидин практически не обладал антимикробной активностью. При концентрации мономера 200 мг/мл зона подавления роста *S. aureus* составила $10 \pm 0,6$ мм, *P. aeruginosa* $8 \pm 1,2$ мм и *C. albicans* $8 \pm 0,5$ мм. При этом, его химическая фиксация в элементарные звенья полисахарида даже в наименьшем количестве, обеспечивало полимерным соединениям соответствующую активность. Эти сравнительные данные подтверждают необходимость присутствия множества физиологически активных гуанидиновых группировок в цепи полисахарида для проявления наиболее высокого уровня антимикробной активности.

Важное значение в определении антимикробной активности и токсичности катионных соединений играют низкомолекулярные противоионы, функция которых заключается в компенсации положительных зарядов, расположенных в макромолекулярной цепи [22, 23]. Синтезированные гуанидинсодержащие производные пектина являются положительно заряженными полимерными соединениями. Эти сведения позволяют сделать заключение, что при одинаковых физико-химических характеристиках катионных полимеров, но различных противоионах величина антимикробного воздействия может сильно варьировать. В связи с этим представлялось важным исследовать влияние противоионов на уровень активности гуанидинсодержащих производных пектина.

Результаты исследования (рисунок 3) показали, что природа противоиона существенно влияет на антимикробные свойства гуанидинсодержащих про-

изводных пектина. Полимерные соли исследуемых образцов, полученные нейтрализацией гуанидиновых групп сильными неорганическими кислотами, обладали практически одинаковым уровнем антимикробной активности. Однако протонирование гуанидиновых фрагментов карбоксилат-анионами органических кислот, приводило к снижению противомикробной эффективности. С большой вероятностью, такая закономерность обусловлена донорно-акцепторными свойствами противоионов, в последствии оказывающих влияние на перераспределение электронной плотности в гуанидиновых группировках, расположенных вдоль основной макроцепи пектина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный анализ гуанидинсодержащих производных пектина с различными характеристиками показал, что выраженность антимикробного действия синтезированных соединений в отношении бактерий и грибов рода *Candida* зависит от количественного содержания катионных группировок и природы противоиона. Так, было выявлено, что наибольшей активностью обладает образец со степенью замещения 90 моль% и значением pK_a $9,2 \pm 0,1$. Нейтрализация гуанидиновых групп карбоксилсодержащими кислотами приводит к снижению антимикробной активности полимерных солей. Эти данные позволяют прогнозировать создание наиболее подходящей структуры, обладающей требуемой антимикробной активностью. При этом, несомненно возникают вопросы, охватывающие зависимость антимикробной активности от молекулярных характеристик образцов.

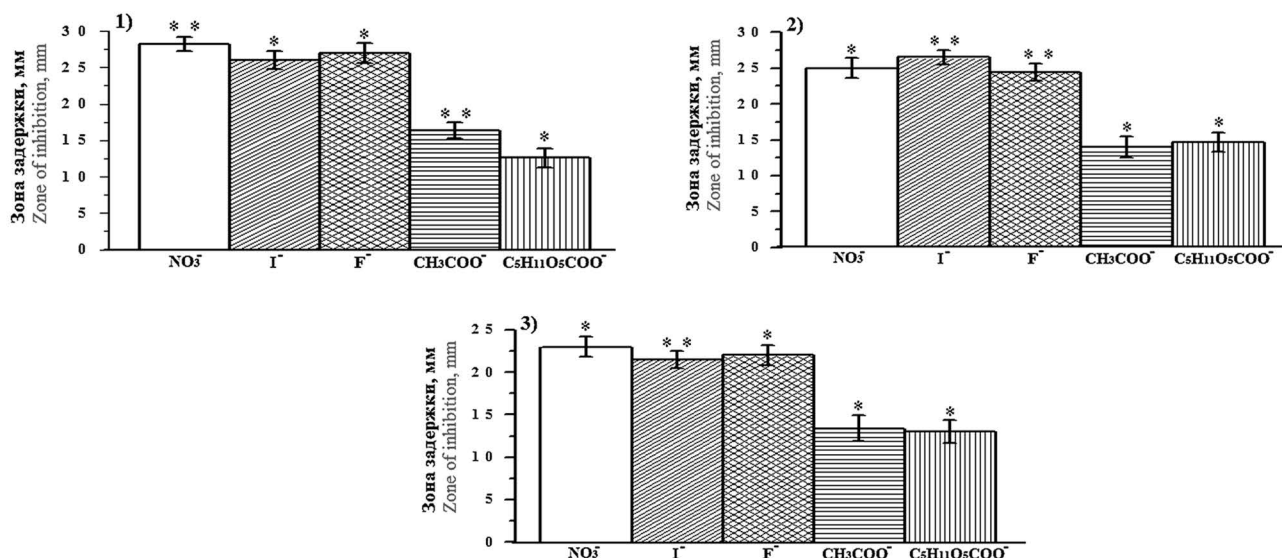


Рисунок 3. Влияние противоионов на антимикробные свойства гуанидинсодержащих производных пектина (СЗ = 90 моль%).

1 – *S. aureus*; 2 – *P. aeruginosa*; 3 – *C. albicans* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 3-4$)

Figure 3. The effect of counterions on the antimicrobial properties of guanidine-containing pectin derivatives (DS = 90 mol%).

1 – *S. aureus*; 2 – *P. aeruginosa*; 3 – *C. albicans* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 3-4$)

Эти вопросы, еще не изучены, но от их решения несомненно будет зависеть создание нового класса высокоэффективных и низкотоксичных антимикробных полимеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aslam B., Wang W., Arshad M. I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M. H. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*. 2018;11:1645–1658. DOI: 10.2147/idr.s173867.
2. Ergene C., Yasuhara K., Palermo E. F. Biomimetic antimicrobial polymers: recent advances in molecular design. *Polymer Chemistry*. 2018;9:2407–2427. DOI: 10.1039/C8PY00012C.
3. Babutan I., Lucaci A., Botiz I. Antimicrobial Polymeric Structures Assembled on Surfaces. *Polymers*. 2021;13(10):1552. DOI: 10.3390/polym13101552.
4. Namivandi-Zangeneh R., Wong E. H., Boyer C. Synthetic Antimicrobial Polymers in Combination Therapy: Tackling Antibiotic Resistance. *ACS Infectious Diseases*. 2021;7(2):215–253. DOI:10.1021/acsinfectdis.0c00635.
5. Mortazavian H., Foster L. L., Bhat R., Patel S., Kuroda K. Decoupling the functional roles of cationic and hydrophobic groups in the antimicrobial and hemolytic activities of methacrylate random copolymers. *Biomacromolecules*. 2018;19:4370–4378. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b01256.
6. Molotkovsky R. J., Galimzyanov T. R., Ermakov Yu. A. Heterogeneity in Lateral Distribution of Polycations at the Surface of Lipid Membrane: From the Experimental Data to the Theoretical Model. *Materials*. 2021;14:6623. DOI: 10.3390/ma14216623.
7. Yanez-Macías R., Munoz-Bonilla A., De Jesus-Tellez M. A., Maldonado-Textle H., Guerrero-Sánchez C., Schubert U. S., Guerrero-Santos R. Combinations of Antimicrobial Polymers with Nanomaterials and Bioactives to Improve Biocidal Therapies. *Polymers*. 2019;11(11):1789. DOI: 10.3390/polym11111789.
8. Григорьева М. Н., Стельмах С. А., Астахова С. А., Центр И. М., Базарон Л. У., Батоев В. Б., Могнонов Д. М. Синтез сополимеров гидрохлоридов полиалкилгуанидинов и их антибактериальная активность в отношении условно-патогенных микроорганизмов *Bacillus cereus* и *Escherichia coli*. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(2):29–33. DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-2-29-33.
9. Qian L., Guan Y., He B., Xiao H. Modified guanidine polymers: Synthesis and antimicrobial mechanism revealed by AFM. *Polymer*. 2008;49(10):2471–2475. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.03.042.
10. Zhang Z., Peng P., Wu Q., Zhang J., Wu M., Liu J., Yang J. Preparation and antibacterial properties of poly(hexamethylene guanidine hydrochloride) modified ionic waterborne polyurethane. *Progress in Organic Coatings*. 2021;156:106246. DOI: 10.1016/j.porgcoat.2021.106246.
11. Chen S., Li C., Hou T., Cai Y., Liang L., Chen L., Li M. Polyhexamethylene guanidine functionalized chitosan nanofiber membrane with superior adsorption and antibacterial performances. *Reactive and Functional Polymers*. 2019;145:104379. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104379.
12. Ахмедов О. Р., Шомуротов Ш. А., Тураев А. С. Особенности синтеза и антимикробные свойства гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы. *Химия растительного сырья*. 2021;3:73–82. DOI:10.14258/jcprm.2021038705.
13. Шомуротов Ш. А., Ахмедов О. Р., Тураев А. С., Мамадуллаев Г. Х. Противотуберкулезная активность и фармакокинетика полимерных конъюгатов изониазида и этамбутола. *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;6:67–71. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-6-23-27.
14. Keshk S. M. A. S., Bondock S., El-Zahhar A. A., Haija M. A. Synthesis and characterization of novel Schiff's bases derived from dialdehyde cellulose-6-phosphate. *Cellulose*. 2019;26:3703–3712. DOI: 10.1007/s10570-019-02360-w.
15. Zhang L., Yan P., Li Ya., He X., Dai Yu., Tan Z. Preparation and antibacterial activity of a cellulose-based Schiff base derived from dialdehyde cellulose and L-lysine. *Industrial Crops & Products*. 2020;145:112126. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112126.
16. Rawlinson L. B., Ryan S. M., Mantovani G., Syrett J. A., Haddleton D. M., Brayden D. J. Antibacterial Effects of Poly(2-(dimethylamino ethyl)methacrylate) against Selected Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Biomacromolecules*. 2010;11(2):443–453. DOI: 10.1021/bm901166y.
17. Туник Т. В., Немченко У. М., Ганенко Т. В., Юринова Г. В., Джоиев Ю. П., Сухов Б. Г., Злобин В. И., Трофимов Б. А. Синтез и спектральная охарактеризация новых биоразлагаемых производных арабиногалактана для диагностики и терапии. *Известия Российской академии наук. Серия физическая*. 2019;83(3):408–414. DOI: 10.1134/s0367676519030268.
18. Хабриева Р. У., ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: ОАО «Издательство «Медицина»; 2005. 832 с.
19. Гланц С. Медико-биологическая статистика М.: Практика; 1999. 459 с.
20. Munoz-Bonilla A., López D., Fernández-García M. Providing Antibacterial Activity to Poly(2-Hydroxy Ethyl Methacrylate) by Copolymerization with a Methacrylic Thiazolium Derivative. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(12):4120–4133. DOI: 10.3390/ijms19124120.
21. Timofeeva L. M., Kleshcheva N. A., Moroz A. F., Didenko L. V. Secondary and Tertiary Polydiallylammonium Salts: Novel Polymers with High Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules*. 2009;10(11):2976–2986. DOI: 10.1021/bm900435v.
22. Sharma S. K., Chauhan G. S., Gupta R., Ahn H. Tuning anti-microbial activity of poly(4-vinyl 2-hydroxyethyl pyridinium) chloride by anion exchange reactions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2009;21(2):717–724. DOI: 10.1007/s10856-009-3932-9.
23. Харитонов Е. В., Журавлев О. Е., Червинец В. М., Ворончихина Л. И., Демидова М. А. Синтез и антимикробная активность тетрахлорферратов четвертичного аммония, пиридиния и морфолина. *Химико-фармацевтический журнал*. 2012;46(5):6–8. DOI: 10.30906/0023-1134-2012-46-5-6-8.

REFERENCES

1. Aslam B., Wang W., Arshad M. I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M. H. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*. 2018;11:1645–1658. DOI: 10.2147/idr.s173867.
2. Ergene C., Yasuhara K., Palermo E. F. Biomimetic antimicrobial polymers: recent advances in molecular design. *Polymer Chemistry*. 2018;9:2407–2427. DOI: 10.1039/C8PY00012C.
3. Babutan I., Lucaci A., Botiz I. Antimicrobial Polymeric Structures Assembled on Surfaces. *Polymers*. 2021;13(10):1552. DOI: 10.3390/polym13101552.
4. Namivandi-Zangeneh R., Wong E. H., Boyer C. Synthetic Antimicrobial Polymers in Combination Therapy: Tackling Antibiotic Resistance. *ACS Infectious Diseases*. 2021;7(2):215–253. DOI:10.1021/acsinfectdis.0c00635.
5. Mortazavian H., Foster L. L., Bhat R., Patel S., Kuroda K. Decoupling the functional roles of cationic and hydrophobic groups in the antimicrobial and hemolytic activities of methacrylate random copolymers. *Biomacromolecules*. 2018;19:4370–4378. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b01256.
6. Molotkovsky R. J., Galimzyanov T. R., Ermakov Yu. A. Heterogeneity in Lateral Distribution of Polycations at the Surface of Lipid Membrane: From the Experimental Data to the Theoretical Model. *Materials*. 2021;14:6623. DOI: 10.3390/ma14216623.
7. Yanez-Macías R., Munoz-Bonilla A., De Jesus-Tellez M. A., Maldonado-Textle H., Guerrero-Sánchez C., Schubert U. S., Guerrero-Santos R. Combinations of Antimicrobial Polymers with Nanomaterials and Bioactives to Improve Biocidal Therapies. *Polymers*. 2019;11(11):1789. DOI: 10.3390/polym11111789.

8. Grigor'eva M. N., Stel'makh S. A., Astakhova S. A., Tsenter I. M., Bazarov L. U., Batoev V. B., Mogonov D. M. Synthesis of Polyalkyl-guanidine Hydrochloride Copolymers and Their Antibacterial Activity Against Conditionally Pathogenic Microorganisms *Bacillus Cereus* and *Escherichia Coli*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(2):29–33. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-2-29-33.
9. Qian L., Guan Y., He B., Xiao H. Modified guanidine polymers: Synthesis and antimicrobial mechanism revealed by AFM. *Polymer*. 2008;49(10):2471–2475. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.03.042.
10. Zhang Z., Peng P., Wu Q., Zhang J., Wu M., Liu J., Yang J. Preparation and antibacterial properties of poly(hexamethylene guanidine hydrochloride) modified ionic waterborne polyurethane. *Progress in Organic Coatings*. 2021;156:106246. DOI: 10.1016/j.porgcoat.2021.106246.
11. Chen S., Li C., Hou T., Cai Y., Liang L., Chen L., Li M. Polyhexamethylene guanidine functionalized chitosan nanofiber membrane with superior adsorption and antibacterial performances. *Reactive and Functional Polymers*. 2019;145:104379. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104379.
12. Akhmedov O. R., Shomurotov Sh. A., Turaev A. S. Peculiarities of synthesis and antimicrobial properties of guanidine-containing carboxymethylcellulose derivatives. *Chemistry of plant raw materials* 2021;3:73–82. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2021038705.
13. Shomurotov Sh. A., Akhmedov O. R., Turaev A. S., Mamadullaev G. Kh. Antituberculosis activity and pharmacokinetics of polymer conjugates of isoniazid and ethambutol. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;6:67–71. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-6-23-27.
14. Keshk S. M. A. S., Bondock S., El-Zahhar A. A., Haija M. A. Synthesis and characterization of novel Schiff's bases derived from dialdehyde cellulose-6-phosphate. *Cellulose*. 2019;26:3703–3712. DOI: 10.1007/s10570-019-02360-w.
15. Zhang L., Yan P., Li Ya., He X., Dai Yu., Tan Z. Preparation and antibacterial activity of a cellulose-based Schiff base derived from dialdehyde cellulose and L-lysine. *Industrial Crops & Products*. 2020;145:112126. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112126.
16. Rawlinson L. B., Ryan S. M., Mantovani G., Syrett J. A., Haddleton D. M., Brayden D. J. Antibacterial Effects of Poly(2-(dimethylamino ethyl)methacrylate) against Selected Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Biomacromolecules*. 2010;11(2):443–453. DOI: 10.1021/bm901166y.
17. Tunik T. V., Nemchenko U. M., Ganenko T. V., Yurina G. V., Dzhi-oiev Yu. P., Sukhov B. G., Zlobin V. I., Trofimov B. A. Synthesis and Spectral Characterization of New Biodegradable Arabinogalactan Derivatives for Diagnosis and Therapy. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. 2019;83(3):408–414. (In Russ.) DOI: 10.1134/s0367676519030268.
18. Khabriev R. U., editor. Guidance on the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Moscow: OAO «Izdatel'stvo «Meditsina»; 2005. 832 p. (In Russ.).
19. Glants S. Medical and Biological Statistics. Moscow: Praktika; 1999. 459 p. (In Russ.).
20. Munoz-Bonilla A., López D., Fernández-García M. Providing Antibacterial Activity to Poly(2-Hydroxy Ethyl Methacrylate) by Copolymerization with a Methacrylic Thiazolium Derivative. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(12):4120–4133. DOI: 10.3390/ijms19124120.
21. Timofeeva L. M., Kleshcheva N. A., Moroz A. F., Didenko L. V. Secondary and Tertiary Polydiallylammonium Salts: Novel Polymers with High Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules*. 2009;10(11):2976–2986. DOI: 10.1021/bm900435v.
22. Sharma S. K., Chauhan G. S., Gupta R., Ahn H. Tuning anti-microbial activity of poly(4-vinyl 2-hydroxyethyl pyridinium) chloride by anion exchange reactions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2009;21(2):717–724. DOI: 10.1007/s10856-009-3932-9.
23. Kharitonova E. V., Zhuravlev O. E., Chervinets V. M., Voronchikhina L. I., Demidova M. A. Synthesis and antimicrobial activity of quaternary ammonium, pyridinium, and morpholinium tetrachloroferrates. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;46(5):6–8. DOI: 10.30906/0023-1134-2012-46-5-6-8 (In Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-46-52>
УДК 616.932:577.27



Оригинальная статья / Research article

Определение активности экспериментального противохолерного иммуноэнтросорбента *in vitro* в дот-иммуноанализе

М. В. Овчинникова✉, Е. Г. Абрамова, М. Н. Киреев, Т. Ю. Кириллова, Н. А. Шарапова,
В. В. Рогожин

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

✉ Контактное лицо: Овчинникова Мария Владимировна. E-mail: ovchinnikovamari2020@mail.ru

ORCID: М. В. Овчинникова – <https://orcid.org/0000-0002-1736-7453>; Е. Г. Абрамова – <https://orcid.org/0000-0002-8798-1547>; М. Н. Киреев – <https://orcid.org/0000-0002-3059-4386>; Т. Ю. Кириллова – <https://orcid.org/0000-0002-6001-870X>; Н. А. Шарапова – <https://orcid.org/0000-0002-5289-7783>; В. В. Рогожин – <https://orcid.org/0000-0002-5751-2416>.

Статья поступила: 03.03.2021

Статья принята в печать: 12.04.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. По оценке Всемирной организации здравоохранения, ежегодно от 1 до 4 миллионов человек заражаются холерой, и порядка 143 000 человек становятся жертвой этой инфекции. На данном этапе седьмой пандемии холеры ВОЗ и ее партнеры активно оценивают новые методы в лечении и профилактике холеры в дополнение к существующим традиционным мерам. Сегодня для лечения и профилактики ряда инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта широко применяются энтеросорбенты. Ранее сообщалось о результатах конструирования специфического энтеросорбента, оказывающего нейтрализующее действие в отношении холерного энтеротоксина. Для контроля токсиннейтрализующей активности компонентов и готового экспериментального препарата применяется метод кожной пробы по Крейгу, который имеет существенные недостатки: длительность анализа, использование дорогостоящих биомоделей и т. д. Также важна этическая сторона методов *in vivo*, диктующая необходимость гуманизации экспериментов и замены млекопитающих менее развитыми живыми объектами, использованием физико-химических и иммунохимических систем.

Цель. Совершенствование методических подходов к определению активности полуфабриката и готового препарата энтеросорбента в непрямом дот-иммуноанализе (ДИА) с использованием неферментного диагностикума – наночастиц коллоидного золота.

Материалы и методы. Использовали антитоксические кроличьи иммуноглобулины и экспериментальные серии противохолерного иммуноэнтросорбента. Определение токсиннейтрализующей активности проводили по Крейгу на взрослых кроликах. В непрямом ДИА использовали гидрозоли золота, сорбционно связанный со стафилококковым белком А и стабилизированный раствором ПЭГ-20000.

Результаты и обсуждение. В непрямом ДИА определены значения титров специфических антител в образцах компонентов препарата (от 1:6400 до 1:12800) и готового энтеросорбента (от 1:6400 до 1:25600). Специфичность теста подтверждена отрицательными результатами с нормальными кроличьими иммуноглобулинами. Проведен сравнительный анализ уровня токсиннейтрализующей активности антитоксических иммуноглобулинов и противохолерного энтеросорбента, определенных в кожной пробе по Крейгу и ДИА: коэффициент корреляции составил 0,93 и 0,97 соответственно.

Заключение. Разработанные методические подходы к проведению непрямого ДИА с диагностикумом на основе белка *A. S. aureus* и наночастиц коллоидного золота могут быть использованы для определения уровня активности антитоксических иммуноглобулинов и экспериментального иммуноэнтросорбента, а корреляция результатов тестов *in vitro* и *in vivo* позволяет рекомендовать непрямой ДИА на этапах контроля при изготовлении специфического противохолерного энтеросорбента.

Ключевые слова: холера, противохолерный энтеросорбент, антитоксические иммуноглобулины, титр антител, дот-иммуноанализ, наночастицы коллоидного золота

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

Вклад авторов. М. В. Овчинникова и Е. Г. Абрамова разработали эксперимент. М. Н. Киреев и Н. А. Шарапова сконструировали неферментный диагностикум на основе белка *A. S. aureus* и наночастиц коллоидного золота. Т. Ю. Кириллова и В. В. Рогожин провели исследование специфической активности экспериментального препарата и его составляющих в кожной пробе по Крейгу. М. В. Овчинникова и М. Н. Киреев разработали методические подходы к проведению непрямого ДИА для определения активности сконструированного энтеросорбента. М. В. Овчинникова и Е. Г. Абрамова участвовали в написании текста статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении полученных результатов.

Для цитирования: Овчинникова М. В., Абрамова Е. Г., Киреев М. Н., Кириллова Т. Ю., Шарапова Н. А., Рогожин В. В. Определение активности экспериментального противохолерного иммуноэнтросорбента *in vitro* в дот-иммуноанализе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):46–52. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-46-52>

Determination of the Activity of an Experimental Anti-choleric Immunoenterosorbent *in Vitro* in Dot-immunoanalysis

Maria V. Ovchinnikova✉, Elena G. Abramova, Michail N. Kireev, Tatiana Yu. Kirillova,
Natalia A. Sharapova, Vadim V. Rogozhin

Russian Research Anti-Plague Institute Microbe, 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia

✉ Corresponding author: Maria V. Ovchinnikova. E-mail: ovchinnikovamari2020@mail.ru

© Овчинникова М. В., Абрамова Е. Г., Киреев М. Н., Кириллова Т. Ю., Шарапова Н. А., Рогожин В. В., 2022

© Ovchinnikova M. V., Abramova E. G., Kireev M. N., Kirillova T. Yu., Sharapova N. A., Rogozhin V. V., 2022

ORCID: Maria V. Ovchinnikova – <https://orcid.org/0000-0002-1736-7453>; Elena G. Abramova – <https://orcid.org/0000-0002-8798-1547>; Michail N. Kireev – <https://orcid.org/0000-00023059-4386>; Tatiana Yu. Kirillova – <https://orcid.org/0000-0002-6001-870X>; Natalia A. Sharapova – <https://orcid.org/0000-0002-5289-7783>; Vadim V. Rogozhin – <https://orcid.org/0000-0002-5751-2416>.

Received: 03.03.2021

Revised: 12.04.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. At the rate of World health organization from 1 to 4 million people annually get infected with cholera, and around 143 000 people become a victim of this infection. At this point of seventh pandemic WHO and its partners actively evaluate new methods of treatment and prevention of cholera in addition to existing traditional methods. Today enterosorbents are widely used for treatment and prevention of number of infectious diseases of the gastrointestinal tract. Previously reported about results of construction of specific enterosorbent, which having a neutralizing effect regard to choleric enterotoxin. For toxin-neutralizing activity of components and finalized product control applied Craig dermal test method, which have significant disadvantages: duration of analysis, using expensive biomodels, etc. Ethical side of *in vivo* methods is also important, which dictating necessity of experiment humanization and replacing mammals to less evolved living objects, using physicochemical and immunochemical systems.

Aim. Methodical approach improvement of definition activity of semi-finalized and completed enterosorbent product in indirect in dot-immunoanalysis (DIA) with using non-enzymatic diagnosticum based on colloidal gold nanoparticles.

Materials and methods. Were used antitoxic rabbit immunoglobulins and experimental series of anicholeraic immunoenterosorbent. Definition of toxin-neutralizing activity carried out by Craig test on adult rabbits. In indirect DIA were used hydrosol gold, connected with staphylococcus protein A by sorption and stabilized with solution PEG-20000.

Results and discussion. In indirect DIA identified titers of specific antibody in product component samples composed from 1:6400 to 1:12800, while in completed enterosorbent the titers composed from 1:6400 to 1:25600. Specificity of test is confirmed by negative results with standard rabbit immunoglobulins. Comparative analysis of toxin-neutralizing activity level of antitoxin immunoglobulins and anicholeraic enterosorbent, determined in Craig dermal test and DIA was performed: the correlation coefficient composed 0,93 and 0,97 respectively.

Conclusion. Developed methodical approaches to indirect DIA conduction with *S. aureus* protein A based diagnosticum and colloidal gold nanoparticles can be used for determination of antitoxic activity level of immunoglobulins and experimental immunoenterosorbent. Correlation of *in vitro* and *in vivo* tests allows to recommend indirect DIA on control stages during specific anticholeraic enterosorbent production.

Keywords: cholera, anti-choleric enterosorbent, antitoxic immunoglobulins, antibody titer, dot-immunoanalysis, colloidal gold nanoparticles

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. Ovchinnikova and Elena G. Abramova developed experiment. Michail N. Kireev and Natalia A. Sharapova construct *S. aureus* protein A and colloidal gold nanoparticles based non-enzymatic diagnosticum. Tatiana Yu. Kirillova and Vadim V. Rogozhin conduct investigation of specific activity of experimental product and it's components in Craig dermal test. Maria V. Ovchinnikova and Michail N. Kireev developed methodical approaches to conducting indirect DIA for determination constructed enterosorbent activity. Maria V. Ovchinnikova and Elena G. Abramova participated in writing text of the article. All authors took part in the discussion of the results.

For citation: Ovchinnikova M. V., Abramova E. G., Kireev M. N., Kirillova T. Yu., Sharapova N. A., Rogozhin V. V. Determination of the activity of an experimental anti-choleric immunoenterosorbent *in vitro* in dot-immunoanalysis. *Drug development & registration*. 2022;11(2):46–52. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-46-52>

ВВЕДЕНИЕ

Холера остается одной из серьезных проблем мирового здравоохранения в связи с эпидемиями на различных континентах и появлением измененных вариантов *Vibrio cholerae* O1. По оценке Всемирной организации здравоохранения, ежегодно от 1 до 4 миллионов человек заражаются холерой, и порядка 143 000 человек становятся жертвой этой инфекции. До 2030 г. борьба с холерой является одной из приоритетных задач глобальной дорожной карты ВОЗ, в которой поставлена цель по сокращению смертности от холеры на 90 % и прекращению распространения инфекции в 20 странах¹. Неблагоприятный прогноз по холере в мире, обусловленный

продолжающимися масштабными эпидемиями и крупными вспышками, определяет неблагоприятный прогноз по холере для России в плане угрозы заносов инфекции в результате интенсивной миграции населения, в том числе из стран, неблагополучных по холере [1, 2]. На данном этапе седьмой пандемии холеры ВОЗ и ее партнеры активно проводят оценку новых методов в лечении и профилактике данного конвенционного заболевания в дополнение к существующим традиционным мерам^{2,3}.

В последнее время для лечения и профилактики ряда инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта стали широко применяться энтеросорбенты, которые, по мнению многих авторов, являются перспективным лекарственным средством [3]. При

¹ Заболеваемость холерой в мире снизилась, ключевые эндемичные страны сообщают об успехах в борьбе с холерой. 19 декабря 2019 г. Женева. Доступно по: <https://www.who.int/ru/news-room/detail/> Ссылка активна на 19.01.2020.

² Холера. Доступно по: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cholera>. Ссылка активна на 19.01.2020.

³ Cholera control. Available at: <https://www.gtfcc.org/> Accessed: 20.01.2020.

холере, ротавирусных гастроэнтеритах, отравлении стафилококковым энтеротоксином использование энтеросорбентов показано с целью купирования диарейного синдрома [4]. Энтеросорбенты рекомендуют назначать уже на догоспитальном этапе, не дожидаясь этиологического подтверждения диагноза [5]. При этом может быть достигнуто более легкое течение заболевания и быстрое выздоровление по сравнению с традиционными схемами лечения. Но энтеросорбенты в большинстве своем не отличаются селективностью по отношению к конкретным патологическим объектам, что зачастую сказывается на эффективности их применения. Поэтому в настоящее время активно развивается направление, связанное с разработкой селективных энтеросорбционных препаратов со специфическими свойствами, в том числе антитоксической направленности [6].

Ранее сообщалось о результатах экспериментов по конструированию специфического энтеросорбента против холеры, оказывающего нейтрализующее действие в отношении энтеротоксина холерного вибриона [7]. Антитоксическая селективность экспериментального противохолерного препарата обусловлена наличием на поверхности хитозановой матрицы молекул антитоксических иммуноглобулинов, выделенных из иммунной сыворотки крови кроликов-продуцентов, иммунизированных холерным токсином.

Неотъемлемой частью биотехнологической схемы изготовления иммуноэнтеросорбента является контроль токсиннейтрализующей активности его компонентов и готового экспериментального препарата в целом. Для постановки контрольных тестов применяется метод кожной пробы по Крейгу, считающийся «золотым стандартом» определения активности холерного токсина. При всех своих преимуществах – высокой чувствительности и специфичности – данный метод имеет существенные недостатки: длительность анализа (не менее 5–7 сут. с учетом предварительного титрования токсина), использование дорогостоящих биомоделей, потенциальная возможность аллергизации персонала при обработке животных. Не остается без внимания и этическая сторона использования методов *in vivo*, диктующая необходимость гуманизации экспериментов и замены млекопитающих – традиционных лабораторных животных менее развитыми живыми объектами. Альтернативные методы предполагают использование микроорганизмов, культуры клеток или тканей, растительных объектов, а также компьютерных и математических моделей, физико-химических и иммунохимических систем [8, 9]. В литературе имеются сообщения о применении иммуоферментного анализа с использованием GM1-ганглиозидов (GM1-ИФА) для определения *in vitro* активности холерного токсина штамма *V. cholerae* 569B [10]. Группой авторов был сконструирован иммуносенсор с применением наночастиц с золотым покрытием для определения хо-

лерного вибриона [11]. ИФА является одним из наиболее чувствительных и удобных методов иммуноанализа, однако его недостатками являются применение токсичных, канцерогенных хромогенов и необходимость использования аппаратуры для учета результатов. Указанные недостатки обусловили необходимость совершенствования методических подходов к определению активности полуфабриката и готового препарата противохолерного энтеросорбента с использованием безынструментальных тест-систем на основе неферментных диагностикумов.

Целью исследований являлось определение уровня токсиннейтрализующей активности специфических кроличьих иммуноглобулинов и экспериментального противохолерного иммуноэнтеросорбционного препарата в непрямом дот-иммуноанализе с использованием диагностикума на основе наночастиц коллоидного золота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали антитоксические кроличьи иммуноглобулины (8 образцов) и экспериментальные серии противохолерного иммуноэнтеросорбента (8 образцов).

Определение токсиннейтрализующей активности антитоксических иммуноглобулинов и энтеросорбента проводили *in vivo* по Крейгу на взрослых кроликах [12] и *in vitro* в непрямом дот-иммуноанализе (ДИА) с использованием экспериментального конъюгата на основе наночастиц коллоидного золота и белка *A Staphylococcus aureus*.

Для постановки кожной пробы по Крейгу использовали светло-серых кроликов породы шиншилла массой 2,5–3,0 кг. В качестве антигена использовали холерный токсин, содержащий от 2 до 32 000 кожных доз. Содержание токсина в одной кожной дозе соответствовало 15 мкг/мл (стандартный образец предприятия «Тест-токсин холерный» сер. 01-09-13).

Для определения токсиннейтрализующей активности экспериментальных серий энтеросорбент разводили в 0,9%-м растворе натрия хлорида до концентрации 10 %, затем готовили ряд последовательных двукратных разведений с 1:200 до 1:12800. К 0,2 мл каждого разведения экспериментального энтеросорбента добавляли 0,2 мл рабочего разведения холерного токсина. Смеси инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 ± 1 °C, после чего центрифугировали при 8 тыс. об/мин в течение 10 мин. Супернатант декантировали и вводили внутрикожно кроликам с предварительно депилированной кожей в боковые области параллельно линии позвоночника с интервалами в 3 см между точками укола в количестве 50 мкл. Кроликам контрольной группы аналогично вводили 2 кожные дозы холерного токсина в том же объеме 0,9%-го раствора натрия хлорида.

Учет реакции проводили через 18–20 ч. За титр токсиннейтрализующей активности специфического энтеросорбента принимали последнее разведение

исследуемого образца в реакционной смеси с холерным токсином, где не наблюдали кожной реакции в виде папул и зоны некроза или имела место папула менее 5 мм.

Выявлено, что титры активности экспериментальных серий специфического энтеросорбента и исходных иммуноглобулинов, входящих в состав сконструированного препарата, соответствовали значениям от 1:16 000 до 1:24 000 и 1:10 000 и 1:16 000 соответственно.

Полученные результаты являлись исходными значениями для определения содержания антитоксических единиц (АЕ/мл) в специфическом препарате.

Для определения АЕ/мл в пробирках готовили разведения антитоксического энтеросорбента в 0,9%-м растворе натрия хлорида, содержащие 80, 60, 40, 30 и 20 АЕ в 1 мл. По 0,2 мл каждого разведения энтеросорбента переносили в пробирки и добавляли по 0,2 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида и по 0,4 мл из разведения холерного токсина, содержащего 20 опытных доз/мл, получая содержание в сыворотке 2, 1,5, 1, 0,75, 0,5 АЕ. Образцы выдерживали при температуре 37 ± 1 °С в течение 30 мин. После инкубации по 0,1 мл каждого разведения вводили внутрикожно двум кроликам начиная с 2 АЕ. Учет реакции проводили через 18–20 ч, регистрируя наличие или отсутствие папул на месте введения смеси испытуемого материала и токсина.

Для проведения непрямого ДИА с неферментным диагностикумом на основе белка А и наночастиц коллоидного золота использовали общепринятую методику [13] с модификациями Л. А. Дыкмана с соавт. [14]. В качестве конъюгатов использовали экспериментальный диагностикум (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»), представляющий собой гидрозоль золота со средним размером частиц 15–17 нм, сорбционно связанный со стафилококковым белком А и стабилизированный 0,5%-м раствором ПЭГ-20000 [15].

В качестве твердой фазы использовали нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) Millipore (0,45 мкм), которую сенсibilизировали холерным тест-токсином в концентрации 20 мкг/мл. Мембрану подсушивали в течение 2 ч при 37 °С. Образцы антитоксических иммуноглобулинов разводили последовательно двукратно с 1/50 в 0,01 М ФСБ pH 7,2 и наносили на НЦМ аликвотами по 2,0 мкл в виде последовательного ряда точек.

Пробоподготовка противохолерного иммуноэнтеросорбента, который представляет собой нерастворимый в воде аморфный белый порошок, заключалась в предварительном разведении препарата до 10 % концентрации (экспериментально обоснованное значение) в 0,01 М растворе фосфатного буфера (ФСБ) pH 7,2.

Образцы энтеросорбента подвергали тщательной гомогенизации на вортексе и делали последовательные двукратные разведения в микротитровальных планшетах, начиная с 1/50. Планшеты с разведениями помещали на лабораторный шейкер и при посто-

янных колебательных движениях (150/1 мин) наносили исследуемые образцы на сенсibilизированную НЦМ аликвотами по 2,0 мкл в виде последовательного ряда точек. Далее для блокировки свободных сайтов связывания мембрану погружали в 3%-й раствор бычьего сывороточного альбумина на 15 мин при 20 °С. В качестве отрицательного контроля использовали иммуноглобулины нормальные кроличьи. Мембраны выдерживали до полного высушивания при 37 °С. После инкубации и промывки мембраны с нанесенными образцами помещали в пакет-камеры и добавляли не менее 400 мкл конъюгата на основе белка А и наночастиц коллоидного золота. По истечении 1–3 ч учитывали результаты ДИА. При необходимости проводили процедуру усиления цветового сигнала, для чего мембраны погружали в раствор физического проявителя, состоящего из 0,5%-го раствора лимонной кислоты, 0,2%-го раствора метола и 0,2%-го раствора нитрата серебра. Проявитель готовили непосредственно перед использованием. После обработки НЦ мембрану промывали водой деионизованной и подсушивали при температуре 20 °С.

Учет результатов проводили визуально, принимая за титр активности специфического иммуноэнтеросорбента наибольшее разведение образца, при котором в результате реакции с конъюгатом регистрировали четко различимое красное пятно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биотехнологическая схема изготовления экспериментального противохолерного энтеросорбционного препарата предполагает проведение контрольных исследований по определению антитоксической активности полученных антитоксических кроличьих иммуноглобулинов – активного компонента иммуноэнтеросорбента и готового препарата. В рамках настоящего исследования были усовершенствованы методические подходы к определению уровня активности полуфабрикатов и готового препарата в прямом варианте ДИА с использованием экспериментального неферментного диагностикума на основе белка А *S. aureus* и наночастиц коллоидного золота со средним размером 15–17 нм. Одним из способов повышения чувствительности, информативности и экспрессности иммуноанализов является использование наноматериалов различной природы [16]. Наночастицы коллоидного золота в последнее десятилетие весьма востребованы в мембранных тестах вместо традиционных ферментных меток, что обусловлено интенсивной красной окраской золотосодержащего маркера дает и возможностью визуальной оценки результатов иммунохимической реакции [17, 18]. По данным литературы, конъюгаты с КЗ превосходят таковые с изотопными, флуоресцентными и ферментными метками по чувствительности, стабильности, простоте выполнения анализа и экономичности [19]. Белок А находит широкое распространение в иммуноанализе из-за своей способ-

ности специфически взаимодействовать с Fc-фрагментами иммуноглобулинов сыворотки крови животных, что позволяет выявлять специфические антитела [20]. Немаловажно, что белок А является универсальным компонентом, заменяющим антивидовые иммуноглобулины в непрямом ДИА.

В ходе работы в каждой пробе по Крейгу был определен уровень активности исходных компонентов энтеросорбента – антитоксических иммуноглобулинов, выделенных из антитоксической сыворотки кроликов и экспериментального препарата. Установлено, что активность исходных антитоксических иммуноглобулинов, определенная в АЕ/мл, составила от 7600 до 11 500, а активность иммуносорбента соответствовала значениям от 12 500 до 20 500 АЕ/мл (таблица 1).

Таблица 1. Токсиннейтрализующая активность исходных антитоксических иммуноглобулинов и экспериментальных серий антитоксического противохолерного энтеросорбента в кожной пробе по Крейгу

Table 1. Toxin-neutralizing activity of initial antitoxic immunoglobulins and experimental series of antitoxic anticholera enterosorbent in Craig dermal

№ серии энтеросорбента № series of enterosorbent	Активность исходных иммуноглобулинов, АЕ/мл Activity of initial immunoglobulins, AU/ml	Активность специфического энтеросорбента, АЕ/мл Activity of specific enterosorbent, AU/ml
01	10 500	14 500
02	11 500	18 000
03	10 500	20 500
04	9400	18 500
05	10 500	14 500
06	7600	18 500
07	7600	12 500
08	7600	12 500

При тестировании противохолерного энтеросорбента в непрямом ДИА уровень активности регистрировали в титрах от 1:6400 до 1:25 600 (рисунок 1). Специфичность теста подтверждена отрицательными результатами ДИА с нормальными кроличьими иммуноглобулинами (отрицательный контроль).

Для выявления корреляции результатов ДИА и кожной пробы по Крейгу был проведен сравнительный анализ результатов определения в указанных тестах активности экспериментальных серий специфического энтеросорбента (таблица 2), а также экспериментальных серий специфических иммуноглобулинов серий, входящих в состав энтеросорбционного препарата (таблица 3). Коэффициент корреляции составил $r=0,93$ и $r=0,97$ соответственно, что позволяет рекомендовать использование непрямого ДИА как альтернативного метода пробы по

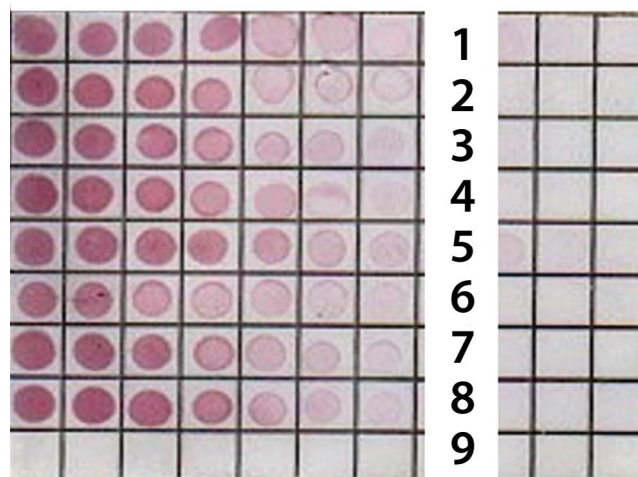


Рисунок 1. Результаты определения уровня активности противохолерного энтеросорбента в непрямом дот-иммуноанализе.

1–8 ряды – двукратные разведения энтеросорбента серий 01-08 с 1:100; титр 1:6400–1:25 600; 9 ряд – иммуноглобулины нормальные кролики (отрицательный контроль)

Figure 1. The results of determination of activity level of anticholera enterosorbent in indirect dot-immunoanalysis.

1–8 ranks – double dilutions of enterosorbent 01-08 series from 1:100; titer 1:6400–1:25600; 9 rank – standard rabbit immunoglobulins (negative control)

Крейгу для контроля антитоксической активности специфических иммуноглобулинов и специфического энтеросорбента.

Таблица 2. Специфическая активность экспериментального антитоксического энтеросорбента в тестах *in vivo* (кожная проба по Крейгу) и *in vitro* (непрямой дот-иммуноанализ)

Table 2. Specific activity of experimental antitoxic enterosorbent in tests *in vivo* (Craig dermal test) and *in vitro* (indirect dot-immunoanalysis)

№ серии антитоксического энтеросорбента № series of antitoxic enterosorbent	Специфическая активность, АЕ/мл Specific activity, AU/ml	Титр специфических антител в ДИА, реципрокный титр Titer of specific antibodies in DIA, reciprocal titer
01	14 500	25 600
02	18 000	12 800
03	20 500	12 800
04	18 500	12 800
05	14 500	25 600
06	18 500	6400
07	12 500	12 800
08	12 500	12 800
Средняя геометрическая титра: Geometric mean titer:	16 714	15 542

Таблица 3. Специфическая активность экспериментальных серий антитоксических иммуноглобулинов в тестах *in vivo* (кожная проба по Крейгу) и *in vitro* (непрямой дот-иммуноанализ)

Table 3. Specific activity of experimental antitoxic immunoglobulins in tests *in vivo* (Craig dermal test) and *in vitro* (indirect dot-immunoanalysis)

№ серии специфических иммуноглобулинов № series of antitoxic enterosorbent	Специфическая активность, АЕ/мл Specific activity, AU/ml	Титр специфических антител в ДИА, реципрокный титр Titer of specific antibodies in DIA, reciprocal titer
001	10 500	12 800
002	11 500	12 800
003	10 500	6400
004	9400	6400
005	10 500	12 800
006	7600	12 800
007	7600	6400
008	7600	6400
Средняя геометрическая титра: Geometric mean titer:	9400	9600

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанные методические подходы с применением диагностикума на основе белка *A. S. aureus* и наночастиц коллоидного золота могут быть использованы для определения уровня активности антитоксических иммуноглобулинов и экспериментального иммуноэнтросорбента на этапах контроля при изготовлении специфического энтеросорбционного препарата против холеры.

ЛИТЕРАТУРА

- Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Кругликов В.Д., Титова С.В., Куриленко М.П., Пичурина Н.Л., Водопьянов А.С., Левченко Д.А., Иванова С.М., Водопьянов С.О., Олейников И.П. Прогноз по холере на 2019 г. на основании анализа эпидемиологической обстановки в мире, СНГ и России в 2009–2018 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;(1):64–73. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-64-73.
- Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Монахова Е.В., Левченко Д.А., Янович Е.Г., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б., Ежова М.И., Подойницына О.А. Характеристика эпидемиологической ситуации по холере в мире и в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;(1):43–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-43-51.
- Учайкин В.Ф., Новокшенов А.А., Соколова Н.В. Энтеросорбция – эффективный метод этиопатогенетической терапии острых кишечных инфекций. *Детские инфекции*. 2005;(3):39–43.
- Захаренко С.М. Энтеросорбция в практике инфекциониста. *Русский медицинский журнал*. 2010;18(30):1829–1834.
- Ратникова Л.И., Пермитина М.И., Попилов А.Н. Эффективность энтеросорбентов при острых кишечных инфекциях. *Врач*. 2007;(7):36–37.

- Кожевникова Г.М., Ющук Н.Д., Бахтина Ю.А. Патогенетическая терапия острых кишечных инфекций. *Медицина критических состояний. Инфекции*. 2004;(6):3–6.
- Овчинникова М.В., Абрамова Е.Г., Кириллова Т.Ю., Плотников И.А., Никифоров А.К., Адамов А.К. Антитоксическая активность противохолерного энтеросорбционного препарата в опытах *in vivo* антитоксическая активность противохолерного энтеросорбционного препарата в опытах *in vivo*. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2018;14(4):48–53.
- Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. М.: Профиль; 2010. 358 с.
- Тертон М., Бангхем Д.Р., Колкотт К.А. Новые методы иммуноанализа. М.: Мир; 1991. 280 с.
- Дуракова О.С., Громова О.В., Гаева А.В., Генералов С.В., Ливанова Л.Ф., Клокова О.Д., Волох О.А. Экспериментальное обоснование возможности использования перевиваемой линии клеток CHO-K1 для определения специфической активности компонентов холерной химической вакцины. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;(4):113–116. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-113-116.
- Rashidani J., Eskandari K., Ranjbar R. Application of gold core-shell magnetic nanoparticles immunosensor for detection of vibrio cholera. *Journal of Applied Biotechnology Report*. 2021;(8):71–75.
- Craig J. Preparation of the vascular permeability factor of *V. cholera*. *J. Bacteriol*. 1966;92(3):793–795.
- Большакова Е.А. ИФА и ПЦР – современные методы клинической лабораторной диагностики. *Поликлиника*. 2012;(2):16–22.
- Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы. *АСТА NATURAE*. 2011;3,2(9):16–38.
- Шарапова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Михеева Т.А., Галкина М.В., Краснов Я.М. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010;1(103):63–66.
- Nishat S., Awan F.R., Bajwa S.Z. Nanoparticle-based point of care immunoassays for *in vitro* biomedical diagnostics. *Analytical Sciences*. 2019;(35):123–131.
- Загоскина Т.Ю., Чапоргина Е.Л., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Долгова Т.М., Гаврилова О.В., Тайкова Т.С., Балахонов С.В. Дот-иммуноанализ с использованием антител, меченных наночастицами коллоидного золота, для детекции ботулинического токсина в клиническом материале и пищевых продуктах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017;(4):31–35. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-4-31-35.
- Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Азаев М.Ш., Филатов П.В. Оптимизация условий проявления результатов дот-иммуноанализа в автономном наборе для выявления ортопоксвирусов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2019;24(2):77–83. DOI: 10.18821/1560-9529-2019-24-2-77-83.
- Vera-Cabrera L., Rendon A., Diaz-Rodriguez M. Dot blot assay for detection of anti-diacyltrehalose antibodies in tuberculous patients. *Clin Diagn. Lab. Immunol*. 1999;6:686–689.
- Ghitescu L., Bendayan M. Immunolabeling efficiency of protein A-gold complexes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1990;(38):11523–1530.

REFERENCES

- Moskvitina E. A., Yanovich E. G., Kruglikov V. D., Titova S. V., Kurilenko M. L., Pichurina N. L., Vodop'yanov A. S., Levchenko D. A., Ivanova S. M., Vodop'yanov S. O., Oleynikov I. P. Cholera Forecast for the Year 2019 Based on Assessment of Epidemiological Situation Around the World, Across CIS and Russia in 2009–2018. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(1):64–73. (In Russ.) DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-64-73.
- Noskov A. K., Kruglikov V. D., Moskvitina E. A., Monakhova E. V., Levchenko D. A., Yanovich E. G., Vodop'yanov A. S., Pisanov R. V., Nepomnyashchaya N. B., Ezhova M. I., Podoinitsyna O. A. Charac-

- teristics of the Epidemiological Situation on Cholera in the World and in the Russian Federation in 2020 and Forecast for 2021. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;(1):43–51. (In Russ.) DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-43-51.
3. Uchaikin V. F., Novokshonov A. A., Sokolova N. V. Enterosorbption is an effective method of etiopathogenetic therapy of acute intestinal infections. *Children infections*. 2005;(3):39–43. (In Russ.)
 4. Zakharenko S. M. Enterosorption in the practice of an infectious disease specialist. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2010;18(30):1829–1834. (In Russ.)
 5. Ratnikova L. I., Permitina M. I., Popilov A. N. The effectiveness of enterosorbents in acute intestinal infections. *Vrach*. 2007;(7):36–37. (In Russ.)
 6. Kozhevnikova G. M., Yushchuk N. D., Bakhtina Yu. A. Pathogenetic therapy of acute intestinal infections. *Meditsina kriticheskikh sostoyaniy. Infektsii*. 2004;(6):3–6. (In Russ.)
 7. Ovchinnikova M. V., Abramova E. G., Kirillova T. Yu., Plotnikov I. A., Nikiforov A. K., Adamov A. K. Antitoxic activity of an experimental anticholera enterosorption drug in vivo. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Yu. A. Ovchinnikova*. 2018;14(4):48–53. (In Russ.)
 8. Karkishchenko N. N., Grachev S. V. Guide to laboratory animals and alternative models for biomedical purposes. Moscow: Profil'; 2010. 358 p. (In Russ.)
 9. Terton M., Banghem D. R., Kolkott K. A. New immunoassay methods. Moscow: Mir; 1991. 280 p. (In Russ.)
 10. Durakova O. S., Gromova O. V., Gaeva A. V., Generalov S. V., Livanova L. F., Klokova O. D., Volokh O. A. Experimental Substantiation of the Possibility to Use Finite Cell Line CHO-K1 for Determination of Specific Activity of Components of Chemical Cholera Vaccine. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(4):113–116. (In Russ.) DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-113-116.
 11. Rashidiani J., Eskandari K., Ranjbar R. Application of gold core-shell magnetic nanoparticles immunosensor for detection of vibrio cholera. *Journal of Applied Biotechnology Report*. 2021;(8):71–75.
 12. Craig J. Preparation of the vascular permeability factor of V. cholera. *J. Bacteriol.* 1966;92(3):793–795.
 13. Bol'shakova E. A. ELISA and PCR - modern methods of clinical chesky laboratory diagnostics. *Poliklinika*. 2012;(2):16–22. (In Russ.)
 14. Dykman L. A., Khlebtsov N. G. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent achievements and prospects. *ACTA NATURAE*. 2011;3,2(9):16–38. (In Russ.)
 15. Sharapova N. A., Abramova E. G., Nikiforov A. K., Kireev M. N., Savitskaya L. V., Minaeva L. N., Mikheeva T. A., Galkina M. V., Krasnov Ja. M. Determination of the activity of the anti-rabies sera and heterologous anti-rabies immunoglobulin *in vitro* in the dot immunoassay. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2010;1(103):63–66. (In Russ.)
 16. Nishat S., Awan F. R., Bajwa S. Z. Nanoparticle-based point of care immunoassays for in vitro biomedical diagnostics. *Analytical Sciences*. 2019;(35)2:123–131.
 17. Zagoskina T. Yu., Chaporgina E. A., Markov E. Yu., Popova Yu. O., Dolgova T. M., Gavrilova O. V., Taikova T. S., Balakhonov S. V. Dot-immunoassay using gold nanoparticle marked colloid gold for the detection of botulinic toxin in clinical material and food products. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2017;(4):31–35. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-4-31-35. (In Russ.)
 18. Poltavchenko A. G., Ersh A. V., Azaev M. Sh., Filatov P. V. Optimization of the conditions for the development of the results of the dot-immunoassay in an autonomous kit for the detection of orthopoxviruses. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2019;24(2):77–83. (In Russ.) DOI: 10.18821/1560-9529-2019-24-2-77-83.
 19. Vera-Cabrera L., Rendon A., Diaz-Rodriguez M. Dot blot assay for detection of antidiacyltrehalose antibodies in tuberculous patients. *Clin Diagn. Lab. Immunol.* 1999;6:686–689.
 20. Ghitescu L., Bendayan M. Immunolabeling efficiency of protein A-gold complexes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1990;(38)11:1523–1530.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-53-58>
УДК 615.322:543.42



Оригинальная статья / Research article

Фармакотехнологические исследования биомассы *Chlorella vulgaris* C-2019 как перспективного источника получения антибактериальных веществ

А. В. Митишев¹✉, Е. Е. Курдюков¹, Е. Ф. Семенова², Т. М. Фадеева¹, И. Я. Моисеева¹,
Я. П. Моисеев¹

¹ ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет» (ФГБОУ ВПО «ПГУ»), 440026, Россия, г. Пенза, ул. Красная, д. 40

² Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» (Медакадемия им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского»), 295007, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, проспект Академика Вернадского, д. 4

✉ Контактное лицо: Митишев Александр Владимирович. E-mail: span2361@rambler.ru

ORCID: А. В. Митишев – <http://orcid.org/0000-0002-3327-9744>; Е. Е. Курдюков – <http://orcid.org/0000-0001-9512-6770>; Е. Ф. Семенова – <http://orcid.org/0000-0002-1204-7864>;
Т. М. Фадеева – <http://orcid.org/0000-0001-8315-0888>; И. Я. Моисеева – <http://orcid.org/0000-0003-1168-2871>; Я. П. Моисеев – <http://orcid.org/0000-0002-1342-9776>.

Статья поступила: 09.03.2021

Статья принята в печать: 19.04.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. В настоящее время активно ведутся исследования, направленные на поиск новых биообъектов как источников биологически активных веществ. Это необходимо для того, чтобы получить продуценты, которые будут выгодны в культивировании, поддержании их жизнедеятельности и получении на выходе достаточного количества и высокого качества целевых продуктов. Одним из таких источников могут быть микро- и макроводоросли.

Цель. Целью настоящего исследования является проведение фитохимического анализа для подтверждения наличия широкого спектра БАС, а также исследований по выбору оптимальных параметров экстрагирования биомассы хлореллы C-2019 с целью получения экстрактов с высоким содержанием БАС, обладающих антибактериальным действием (пигменты, флавоноиды).

Материалы и методы. Объектом исследования являлась воздушно-сухая биомасса штамма *Chlorella vulgaris* Beyerinck ИФР C-2019. Влажность, фракционный состав, зольность, экстрактивные вещества определяли по ГФ XIV, 2018. В работе использованы спектрофотометрический, ГЖХ методы, а также метод капельного электрофореза.

Результаты и обсуждение. В результате фитохимического анализа были определены основные БАС биомассы хлореллы штамма C-2019. Доказано наличие белков (64 %), жирных кислот (7 %), фенольных соединений (1,56 %), пигментов (2,46 %), макро- и микроэлементов. Оптимальным соотношением сырье – экстрагент является 1:50. Повышение температуры и продолжительности экстракции увеличивало выход основных БАС.

Заключение. Определен фитохимический состав перспективного растительного сырья. Установлены оптимальные условия экстракции биомассы хлореллы при получении экстракта: соотношение сырье – экстрагент (1:50), экстрагент спирт этиловый 95%-й, температура экстракции 60–80 °С, трехкратная экстракция в течении 60, 60, 60 мин.

Ключевые слова: микроводоросли, *Chlorella vulgaris*, биомасса хлореллы, дробная мацерация, хлорофиллы, каротиноиды, флавоноиды

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

Вклад авторов. А. В. Митишев, Е. Е. Курдюков, Е. Ф. Семенова, Т. М. Фадеева, И. Я. Моисеева придумали и разработали эксперимент. А. В. Митишев, Е. Е. Курдюков, Я. П. Моисеев провели эксперимент, участвовали в обработке данных и в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Митишев А. В., Курдюков Е. Е., Семенова Е. Ф., Фадеева Т. М., Моисеева И. Я., Моисеев Я. П. Фармакотехнологические исследования биомассы *Chlorella vulgaris* C-2019 как перспективного источника получения антибактериальных веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):53–58. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-53-58>

Pharmacotechnological Studies of the Biomass of *Chlorella vulgaris* C-2019 as a Promising Source of Antibacterial Substances

Alexander V. Mitishev¹✉, Evgeniy E. Kurdyukov¹, Elena F. Semenova², Tatyana M. Fadeeva¹,
Inessa Ya. Moiseeva¹, Yakov P. Moiseev¹

¹ Penza State University, 40, Krasnaya str., Penza, 440026, Russia

² Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, 4, Prospekt Vernadsky, Simferopol, Republic of Crimea, 295007, Russia

✉ Corresponding author: Alexander V. Mitishev. E-mail: span2361@rambler.ru

ORCID: Alexander V. Mitishev – <http://orcid.org/0000-0002-3327-9744>; Evgeniy E. Kurdyukov – <http://orcid.org/0000-0001-9512-6770>;
Elena F. Semenova – <http://orcid.org/0000-0002-1204-7864>; Tatyana M. Fadeeva – <http://orcid.org/0000-0001-8315-0888>;
Inessa Ya. Moiseeva – <http://orcid.org/0000-0003-1168-2871>; Yakov P. Moiseev – <http://orcid.org/0000-0002-1342-9776>.

Received: 09.03.2021

Revised: 19.04.2022

Published: 25.05.2022

© Митишев А. В., Курдюков Е. Е., Семенова Е. Ф., Фадеева Т. М., Моисеева И. Я., Моисеев Я. П., 2022

© Mitishev A. V., Kurdyukov E. E., Semenova E. F., Fadeeva T. M., Moiseeva I. Ya., Moiseev Ya. P., 2022

Abstract

Introduction. Currently, research is being actively conducted to find new biological objects as sources of biologically active substances. This is necessary in order to obtain producers who will be profitable in cultivating, maintaining their vital activity and obtaining at the output a sufficient number and high quality of the target products. Micro- and macroalgae can be one of these sources.

Aim. The aim of this study is to conduct a phytochemical analysis to confirm the presence of a wide range of BAC, as well as studies on the selection of optimal parameters for extracting chlorella C-2019 biomass in order to obtain extracts with a high content of BAC that have an antibacterial effect (pigments, flavonoids).

Materials and methods. The object of the study was the biomass of the strain *Chlorella vulgaris* Beyerinck IPPAS C-2019. The fractional composition, humidity, ash content, and extractive substances were determined according to GF XIV, 2018. The work uses spectrophotometric, GLC methods, as well as the method of drip electrophoresis.

Results and discussions. As a result of phytochemical analysis, the main BAC of chlorella biomass of strain C-2019 were determined. The presence of proteins (64 %), fatty acids (7 %), phenolic compounds (1.56 %), pigments (2.46 %), macro – microelements has been proven. The optimal raw material-extractant ratio is 1 : 50. Increasing the temperature and duration of extraction increased the yield of the main BAC.

Conclusion. The phytochemical composition of promising plant raw materials is determined. The optimal conditions for the extraction of chlorella biomass in the preparation of the extract are established: the ratio of raw materials:extractant 1 : 50, extractant ethyl alcohol 95 %, extraction temperature 60–80 °C, triple extraction for 60, 60, 60 minutes.

Keywords: microalgae, *Chlorella vulgaris*, chlorella biomass, fractional maceration, chlorophylls, carotenoids, flavonoids

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. Alexander V. Mitishev, Evgeniy E. Kurdyukov, Elena F. Semenova, Tatyana M. Fadeeva, Inessa Ya. Moiseeva came up with and developed the experiment. Alexander V. Mitishev, Evgeniy E. Kurdyukov, Yakov P. Moiseev conducted an experiment, participated in data processing and participated in writing the text of the article. All the authors participated in the discussion of the results.

For citation: Mitishev A. V., Kurdyukov E. E., Semenova E. F., Fadeeva T. M., Moiseeva I. Ya., Moiseev Ya. P. Pharmacotechnological studies of the biomass of *Chlorella vulgaris* C-2019 as a promising source of antibacterial substances. *Drug development & registration*. 2022;11(2):53–58. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-53-58>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно ведутся поисковые исследования новых биообъектов как источников биологически активных веществ [1]. Это необходимо для того, чтобы получить продуценты, которые будут выгодны в культивировании, поддержании их жизнедеятельности и получении на выходе достаточного количества и высокого качества целевых продуктов. Одним из таких источников могут быть микро- и макроводоросли [2]. Различные штаммы микроводоросли *Chlorella* являются объектами, которые в последнее время привлекают внимание как коммерчески ценные источники широкого спектра соединений [3, 4].

Штаммы хлореллы имеют свои естественные системы для борьбы с бактериями в водной среде. Так, например, этанольный экстракт *Chlorella minutissima* был активен к *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*; водный, метанольный и гексановый экстракты *Chlorella vulgaris* оказывали воздействие на *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. typhi* [5, 6]. Антимикробную активность экстрактов связывают с различными веществами, такими как жирные кислоты, фенольные соединения, пигменты, полисахариды, галогенированные углеводороды.

Механизм антибактериального действия пигментов (каротиноиды, фикобилипротеины, производные хлорофилла), фенольных соединений (флавоноидов –

рутин, кверцетин и кемпферол) и свободных жирных кислот (эйкозапентаеновая кислота, гексадекатриеновая кислота, докозагексаеновая кислота, пальмитолеиновая кислота) связан с их способностью разрушать клеточную стенку бактерий, а полисахаридов увеличивать проницаемость цитоплазматической мембраны [7].

Несомненно, химическая структура биологически активных соединений водорослей отлична от современных антибиотиков, поэтому лекарственные препараты на основе микроводорослей могут оказаться эффективной альтернативой в терапии бактериальных инфекций [7, 8].

Одним из перспективных продуцентов, способных накапливать данные вещества, является новый штамм *Chlorella vulgaris* Beyerinck ИФР C-2019. Штамм отличается высокой скоростью роста и проявляет хорошо выраженные антагонистические свойства при плотности клеток в культуре более 10 млн/мл, гибель бактерий наступает через 6–10 часов культивирования.

В связи с этим **целью настоящего исследования** является проведение фитохимического анализа для подтверждения наличия широкого спектра БАС, а также исследований по выбору оптимальных параметров экстрагирования биомассы хлореллы C-2019 с целью получения экстрактов с высоким содержанием БАС, обладающих антибактериальным действием (пигменты, флавоноиды).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась воздушно-сухая биомасса штамма *Chlorella vulgaris* Beyerinck ИФР С-2019, выращенная глубинным методом на среде Тамия. Влажность, фракционный состав, зольность, экстрактивные вещества определяли по ГФ XIV, 2018 [9]. Протеин определяли методом Кьельдаля. Аминокислотный состав анализировали методом капельного электрофореза на системе капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ»-105М» (ООО «Люмэкс», Россия) [10]. Содержания жира – методом обезжиренного остатка в аппаратах Сокслета (в качестве экстрагента использовали петролейный эфир). Изучение жирно-кислотного состава проводили методом газожидкостной хроматографии после предварительного перевода жирных кислот в метиловые эфиры по методике ГОСТ 31665-2012 на газовом хроматографе «Кристалл 2000М» с капиллярной колонкой HP-FFAP длиной 50 м, внутренним диаметром 0,32 мм, толщиной фазы 0,50 мкм. Содержания фосфора – путем озоления по Пиневиц в модификации Куркаева – спектрофотометрическим методом при длине волны 670 нм; кальций, цинк, железо – комплексонометрией; содержание клетчатки – методом по Геннебергу и Штоману в модификации ЦИНАО [11]. Количественное содержание хлорофиллов, каротиноидов и флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-201 (ЗАО «НПКФ Аквилон», Россия) [12]. Экстракты получали при температуре от 25 до 80 °С методом дробной мацерации. В качестве экстрагентов были использованы: вода очищенная и растворы этанола в концентрации от 30 до 95 %. Соотношение сырье – экстрагент от 1:5 до 1:100 (по массе). Дробную мацерацию проводили при перемешивании с использованием термостатируемого универсального шейкера LOIP LS-110 (ООО «Экрос-Аналитика», Россия), скорость вращения 170 об/мин. Статистическую обработку результатов исследования выполняли согласно ГФ XIV, вып. 1, ОФС.1.1.0013.15 [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измельченная воздушно-сухая биомасса *Chlorella vulgaris* С-2019, выращенная способом глубинного культивирования на питательной среде Тамия, представляет собой бесформенные частицы различной формы и размера темно-зеленого цвета, легкие, оставляющие следы при растирании, имеющие специфический запах и вкус. Результаты фитохимического анализа представлены в таблице 1.

По результатам исследования фракционного состава, представленным в таблице 1, в порошке биомассы хлореллы штамма ИФР С-2019 присутствуют частицы размером от 0,125 до 0,5 мм, причем большинство частиц порошка биомассы имеет размеры 0,125–0,160 мм.

Согласно данным исследования альгомасса *Chlorella vulgaris* ИФР С-2019 содержит большое количество белка.

Таблица 1. Фитохимический анализ порошка биомассы *Chlorella vulgaris* С-2019

Table 1. Phytochemical Analysis of biomass powder *Chlorella vulgaris* С-2019

Показатель Index	Опытные данные Experimental data
Фракционный состав, % Fractional composition	
>0,5	0,06
0,25 > x < 0,5	0,23
0,160 > x < 0,25	6,33
0,125 > x < 0,160	92
<0,125	1,38
Насыпная плотность, г/см ³ Apparent density, g/cm ³	0,66 ± 0,01
Влажность, % Moisture, %	5,75 ± 0,18
Зола, % Ash, %	5,27 ± 0,06
Протеин, % Protein, %	64,61 ± 0,49
Жир, % Fat, %	7,46 ± 0,10
Жирные кислоты, % Fatty acid, %	Линолевая кислота – 30,30 Линоленовая кислота – 6,70 Стеариновая кислота – 2,56 Пальмитиновая кислота – 15,06 Пальмитолеиновая кислота – 18,78 Linoleic acid – 30.30 Linolenic acid – 6.70 Stearic acid – 2.56 Palmitic acid – 15.06 Palmitoleic acid – 18.78
Клетчатка, % Vegetable Fiber, %	5,85 ± 0,33
Фосфор, % Phosphorus, %	1,65 ± 0,24
Каротиноиды, % Carotenoids, %	0,5 ± 0,07
Хлорофиллы, % Chlorophylls, %	1,96 ± 0,11
Флавоноиды, % Flavonoids, %	1,56 ± 0,09

В результате проведенного аминокислотного анализа белка биомассы хлореллы выявлены 14 аминокислот, в том числе незаменимые, содержащиеся в высоких концентрациях (рисунок 1). Так же установлено, что биомасса хлореллы С-2019 содержит 9 жирных кислот с преобладанием полиненасыщенных, основная масса которых приходится на линолевую (30,30 %), пальмитиновую (15,06 %) и пальмитолеиновую (18,78 %) кислоты. В золе биомассы хлореллы С-2019 присутствуют, в значительных количествах, макро- и микроэлементы (фосфор, железо, кальций, цинк и др.). При проведении качественного анализа биомассы С-2019 были обнаружены флавоноиды, каротиноиды и хлорофиллы (см. таблицу 1).

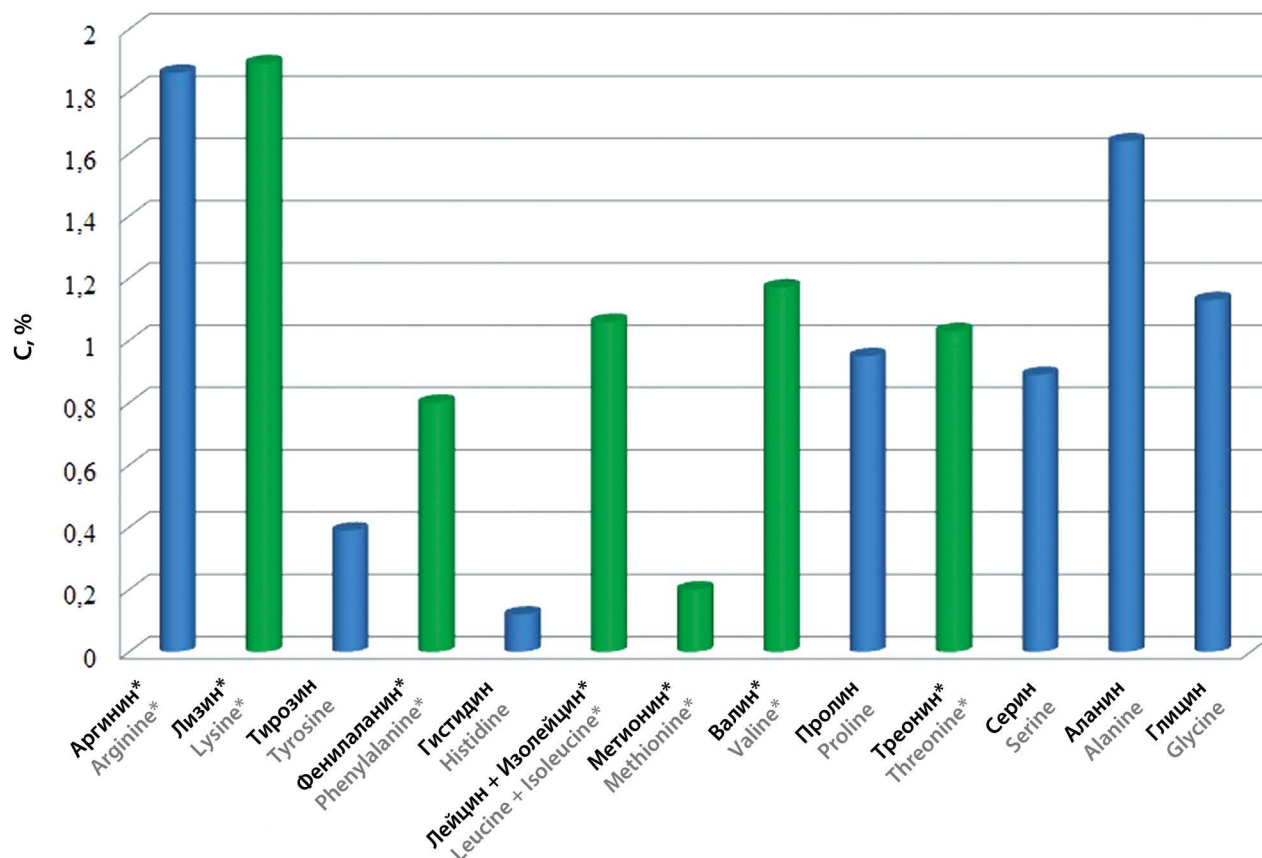


Рисунок 1. Аминокислотный состав биомассы хлореллы (кислотный гидролиз):

* – незаменимые аминокислоты

Figure 1. Amino acid composition of chlorella biomass (acid hydrolysis):

* – essential amino acids

Согласно данным источников литературы, БАС хлореллы, обладающими антибактериальной активностью, являются флавоноиды и пигменты. Следовательно, при проведении исследований по подбору оптимальных параметров экстрагирования биомассы хлореллы С-2019 целесообразно ориентироваться на данные группы веществ. На первом этапе исследования было изучено влияние степени измельчения на полноту экстракции сырья. В результате установлено, что измельчение альгомаcсы до 0,125–0,160 мм способствовало полному извлечению БАС экстрагентом. Вторым этапом исследования являлось изучение влияния природы экстрагента на выход БАС и качественный состав экстракта. Проведенное сравнительное исследование показало, что больше всего экстрактивных веществ извлекается водой (29,83 %), суммы флавоноидов, каротиноидов и хлорофиллов – 90–95 %, спиртом – 0,56–0,83, 0,18–0,19 и 0,58–0,64 % соответственно (таблица 2).

Следующим этапом изучения оптимальных параметров экстракции было проведение эксперимента по определению оптимального соотношения сы-

рье – экстрагент. Согласно данным эксперимента, оптимальным соотношением сырье – экстрагент явилось 1:50 (таблица 3), при котором выход БАС, обладающих антибактериальным действием, из биомассы хлореллы составил $72,83 \pm 0,5$ %. Затем были определены температурные параметры экстракции, обнаружено, что при повышении температуры экстракции с 25 до 80 °C увеличивается выход БАС в 3–4 раза (рисунок 2), при этом время установления равновесия составляет 30–45 мин. При дальнейшем повышении температуры не наблюдалось увеличения концентрации БАС.

Заключительным этапом являлось определение кратности экстракции сырья. Многоступенчатая экстракция в течение 3 часов (трехкратная экстракция этанолом в течение 60, 60, 60 мин при 80 °C) способствовала более полному извлечению БАС, при этом 65 % извлекается первой порцией экстрагента, 25 % второй и 10 % третьей.

При дальнейшем увеличении продолжительности процесса содержание БАС в экстракте значительно не увеличивается.

Таблица 2. Зависимость концентрации извлекаемых БАС от экстрагента

Table 2. Dependence of the concentration of extracted BAS on the extractant

Экстрагент Extractant БАС, % BAS, %	Вода Water	Спирт этиловый, %, об. Ethanol, %, vol.						
		30	40	50	70	80	90	95
Экстрактивные вещества Extractive substances	29,83 ± 0,53	10,11 ± 0,21	6,40 ± 0,12	6,98 ± 0,11	3,78 ± 0,04	5,04 ± 0,05	8,15 ± 0,04	7,30 ± 0,06
Сумма хлорофиллов Total Chlorophylls	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,19 ± 0,04	0,58 ± 0,03	0,64 ± 0,09
Сумма каротиноидов Total Carotenoids	0,01 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,03
Сумма флавоноидов Total Flavonoids	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,04	0,19 ± 0,08	0,22 ± 0,07	0,31 ± 0,01	0,43 ± 0,04	0,56 ± 0,06	0,83 ± 0,08

Таблица 3. Зависимость выхода БАС от соотношения сырье – экстрагент

Table 3. Dependence of the BAS output on the ratio raw material–extractant

Соотношение сырье – экстрагент Ratio «raw material – extractant»	Экстрактивные вещества Extractive substances	Сумма хлорофиллов Total Chlorophylls	Сумма каротиноидов Total Carotenoids	Сумма флавоноидов Total Flavonoids
1:05	7,90 ± 0,06	0,23 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,22 ± 0,06
1:10	7,30 ± 0,11	0,64 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,71 ± 0,03
1:20	7,83 ± 0,08	0,69 ± 0,03	0,23 ± 0,05	0,86 ± 0,06
1:30	7,89 ± 0,05	0,75 ± 0,02	0,25 ± 0,03	1,13 ± 0,09
1:50	14,13 ± 0,09	1,80 ± 0,06	0,52 ± 0,09	1,50 ± 0,13
1:100	20,10 ± 0,42	1,10 ± 0,11	0,32 ± 0,02	1,21 ± 0,11

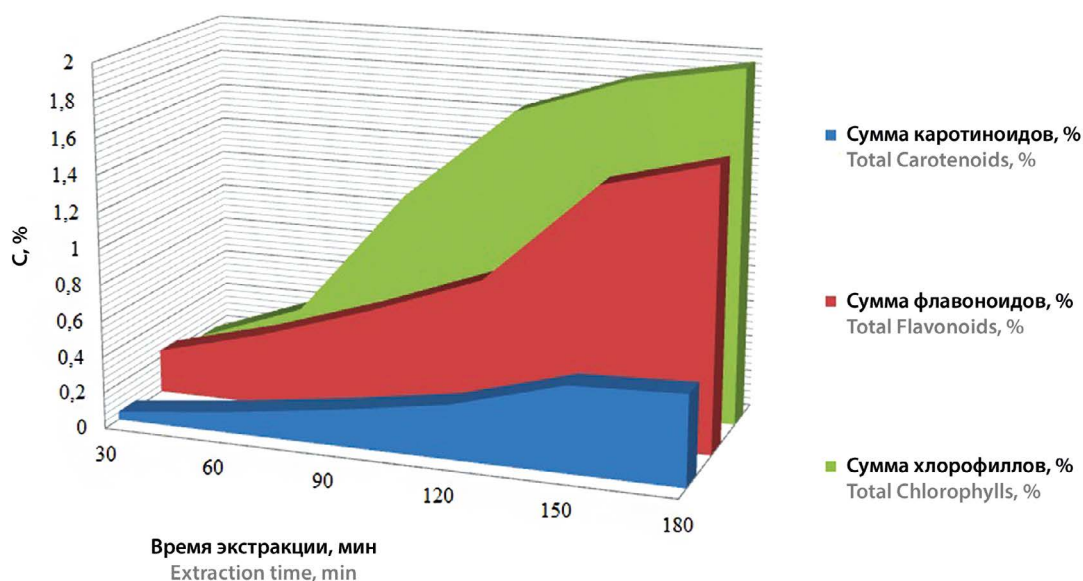


Рисунок 2. Концентрация основных веществ при температуре экстракции 80 °C

Figure 2. The concentration of the main substances at the extraction temperature of 80 °C

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное фитохимическое исследование биомассы *Chlorella vulgaris* Beyerinck ИФР С-2019 позволило выявить широкий спектр БАС. Биомасса хлореллы штамма С-2019 характеризуется высоким содержанием белка (64 %), аминокислот, в том числе

незаменимых (12,27 %), жирных кислот (7 %) с преобладанием полиненасыщенных, основная масса которых приходится на линолевую (30,30 %), пальмитиновую (15,06 %) и пальмитолеиновую (18,78 %) кислоты, а также были обнаружены флавоноиды (1,56 %), каротиноиды (0,5 %) и хлорофиллы (1,96 %). В золе биомассы хлореллы С-2019 присутствуют, в значи-

тельных количествах, макро- и микроэлементы (фосфор, железо, кальций, цинк и др.).

Установлены оптимальные условия экстракции биомассы хлореллы при получении экстракта, содержащего высокие концентрации БАС: соотношение сырье – экстрагент (1:50), экстрагент спирт этиловый 95%-й, t экстракции 60–80 °С, трехкратная экстракция в течение 60, 60, 60 мин.

Таким образом, *Chlorella vulgaris* Beyerinck ИФР С-2019 является перспективным лекарственным сырьем и может служить источником биологически активных соединений (белки, жирные кислоты, пигменты, фенольные соединения), используемых в медицине и ветеринарии.

ЛИТЕРАТУРА

- Andrade L. M., Andrade C. J., Dias M., Nascimento C. A., Mendes M. A. Microalgae for bioremediation of textile wastewater: An overview. *MOJ Food Process Technology*. 2018;6(1):45–58. DOI: 10.15406/MOJFPT.2018.06.00200.
- Barkia I., Saari N., Manning S. R. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine Drugs*. 2019;17(5):E304. DOI: 10.3390/md17050304.
- Abd El-Baky H. H., El-Baroty G. S. Characterization and bioactivity of phycocyanin isolated from *Spirulina maxima* grown under salt stress. *Food & Function*. 2012;3:381–388. DOI: 10.1039/c2fo10194g.
- Guedes A. C., Catarina R. B., Helena M. A., Pereira C. I., Francisco X. M. Microalgal and cyanobacterial cell extracts for use as natural antibacterial additives against food pathogens. *Journal of Food Science and Technology*. 2011;46:862–870. DOI:10.1111/j.1365-2621.2011.02567.x.
- Falaise C., François C., Travers M. A., Morga B., Haure J. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine Drugs*. 2016;14:159. DOI: 10.3390/md14090159.
- Pane G., Cacciola G., Giacco E., Mariottini G., Coppo E. Assessment of the Antimicrobial Activity of Algae Extracts on Bacteria Responsible of External Otitis. *Marine Drugs*. 2015;13:6440–6452. DOI: 10.3390/md13106440.
- Ramaraj S., Ramalingam R., Abeer H., Elsayed F. A. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine Saudi. *Journal of Biological Sciences*. 2019;26:709–722. DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.11.003.
- Lu Y. M., Xiang W., Yong-Huang W. *Spirulina* industry in Inner Mongolia of China: current status and prospects. *Journal of Applied Phycology*. 2011;23:265–269. DOI: 10.1007/s10811-010-9552-4.
- State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Ed. XIV. Tom 2. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii; 2018. 3262 p. (In Russ.)
- Method of measuring the mass fraction of amino acids by capillary electrophoresis using the capillary electrophoresis system "Kapel" M-04-38-2009. Saint Petersburg: ООО «Ljumjeks-marketing»; 2014. 49 p. (In Russ.)
- Tikunova I. V., Drobnitskaya N. V., Artemenko A. I. Reference guide to analytical chemistry and physico-chemical methods of analysis. Moscow: Vysshaja shkola; 2009. 413 p. (In Russ.)
- Beljakov K. V. Methodological approaches to the determination of biologically active substances in medicinal plant raw materials by the spectrophotometric method. Moscow: Medicina; 2004. 186 p. (In Russ.)

REFERENCES

- Andrade L. M., Andrade C. J., Dias M., Nascimento C. A., Mendes M. A. Microalgae for bioremediation of textile wastewater: An overview. *MOJ Food Process Technology*. 2018;6(1):45–58. DOI: 10.15406/MOJFPT.2018.06.00200.
- Barkia I., Saari N., Manning S. R. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine Drugs*. 2019;17(5):E304. DOI: 10.3390/md17050304.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-59-64>
УДК 615.322



Оригинальная статья / Research article

Влияние способа экстракции водорастворимых полисахаридов растений рода *Saussurea* на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов мышей

А. А. Лигачёва¹✉, Е. И. Гулина², Ю. В. Шабанова^{2,3}, Е. С. Трофимова¹,
С. В. Кривошеков², Н. В. Гуркин², М. Н. Шурупова⁴, Е. Ю. Шерстобоев¹, М. Г. Данилец¹,
М. В. Белоусов^{2,3}

¹ НИИФирм им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ, 634028, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 3

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

³ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 30

⁴ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 36

✉ Контактное лицо: Лигачёва Анастасия Александровна. E-mail: vittelli@mail.ru

ORCID: А. А. Лигачёва – <https://orcid.org/0000-0002-3337-1516>; Е. И. Гулина – <https://orcid.org/0000-0002-3234-6845>; Ю. В. Шабанова – <https://orcid.org/0000-0002-7248-3262>;

Е. С. Трофимова – <https://orcid.org/0000-0002-5367-715X>; С. В. Кривошеков – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>; Н. В. Гуркин – <https://orcid.org/0000-0002-1481-0421>;

М. Н. Шурупова – <https://orcid.org/0000-0002-8955-7280>; Е. Ю. Шерстобоев – <https://orcid.org/0000-0002-6178-5329>; М. Г. Данилец – <https://orcid.org/0000-0001-7862-4778>;

М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Статья поступила: 18.03.2022

Статья принята в печать: 20.04.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Со времен открытия молекулы оксида азота многочисленными исследованиями доказано, что он является одним из самых универсальных, многофункциональных медиаторов биологических реакций организма и участвует в формировании врожденного и специфического иммунитета, воспалительного процесса, защите от инфекционных патогенов. Знание эффектов NO важно не только для понимания формирования иммунного ответа, но и для разработки новых инструментов исследования и лечения различных заболеваний. Известно, что полисахариды высших растений широко применяются для активации про- и противовоспалительных реакций. Ранее проведенные исследования показали перспективность более детального изучения иммуномодулирующих свойств растительных полисахаридов рода *Saussurea* DC, возможных механизмов их иммуностимулирующего и противовоспалительного действия в зависимости от происхождения и экстракции.

Цель. Изучить влияние водорастворимых полисахаридов (ВРПС), выделенных из надземной части соссюреи иволистной (*S. salicifolia* (L.) DC.), соссюреи спорной (*S. controversa* DC.), соссюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.) при различных условиях экстракции, на активность фермента NO-синтазы и пролиферацию перитонеальных макрофагов.

Материалы и методы. Использовались химические методы выделения водорастворимых полисахаридов, культуральные и биохимические методы оценки биологической активности.

Результаты и обсуждение. Водорастворимые полисахариды (ВРПС), выделенные различным способом из надземной части соссюреи иволистной (*S. salicifolia* (L.) DC.), соссюреи спорной (*S. controversa* DC.), соссюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.), обладают способностью усиливать продукцию нитритов антигенпрезентирующими клетками на уровне стандартного активатора макрофагов липополисахарида. NO-стимулирующие свойства ВРПС, полученных из *S. controversa* и *S. frolovii* экстрагентом в кислой среде, свободны от примеси эндотоксина. В результате экстракции образцов ВРПС с использованием нейтрального и щелочного экстрагента из всех изученных растений, а также кислого экстрагента из соссюреи спорной, примесь эндотоксина в образцах обнаруживалась. Все исследуемые образцы, в независимости от условий экстракции не обладали цитотоксическими свойствами.

Заключение. Экспериментально показано, что способ экстракции водорастворимых полисахаридов не влияет на цитотоксические свойства, но влияет на наличие/отсутствие примеси эндотоксина в образцах. Установлено, что образцы ВРПС, выделенные из растений рода Соссюреи при помощи кислого экстрагента, не обладают цитотоксическими свойствами и не содержат примеси эндотоксина, а также способствуют значительному усилению продукции оксида азота макрофагами и могут быть использованы для детального изучения иммуномодулирующих свойств и дальнейшей разработки на их основе новых приемов лечения различных заболеваний, требующих коррекции и регуляции функциональной активности иммунных клеток, включая макрофаги.

Ключевые слова: растения рода *Saussurea*, водорастворимые полисахариды, оксид азота, перитонеальные макрофаги, полимиксин Б

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

Вклад авторов. М. В. Белоусов и Е. Ю. Шерстобоев обосновали актуальность работы. С. В. Кривошеков, Н. В. Гуркин и М. Н. Шурупова занимались заготовкой и подготовкой сырья. Е. И. Гулина, Ю. В. Шабанова, Н. В. Гуркин и С. В. Кривошеков получали образцы и провели их стандартизацию. А. А. Лигачёва, Е. С. Трофимова, М. Г. Данилец, Ю. В. Шабанова разработали эксперимент, проводили оценку биологической активности изучаемых веществ, культуральные исследования. М. Г. Данилец, А. А. Лигачева, Е. И. Гулина участвовали в обработке данных. Е. С. Трофимова, М. Г. Данилец, Ю. В. Шабанова проводили теоретические расчеты. М. Г. Данилец, Е. С. Трофимова, А. А. Лигачёва, М. В. Белоусов участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-315-90016.

© Лигачёва А. А., Гулина Е. И., Шабанова Ю. В., Трофимова Е. С., Кривошеков С. В., Гуркин Н. В., Шурупова М. Н., Шерстобоев Е. Ю., Данилец М. Г., Белоусов М. В., 2022

© Ligacheva A. A., Gulina E. I., Shabanova I. V., Trofimova E. S., Krivoshechikov S. V., Gurkin N. V., Shurupova M. N., Sherstoboev E. Yu., Danilets M. G., Belousov M. V., 2022

Соответствие принципам этики. Эксперименты с использованием лабораторных животных выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации и были одобрены биоэтическим комитетом НИИФирм им. Е. Д. Гольдберга, протокол № 171052020 от 18.05.2020 г.

Для цитирования: Лигачёва А. А., Гулина Е. И., Шабанова Ю. В., Трофимова Е. С., Кривошеков С. В., Гуркин Н. В., Шурупова М. Н., Шерстобоев Е. Ю., Данилец М. Г., Белоусов М. В. Влияние способа экстракции водорастворимых полисахаридов растений рода *Saussurea* на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов мышей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):59–64. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-59-64>

Effect of Water-soluble Polysaccharides Plant Extraction of the *Saussurea* Genus on the Activity of Mice Peritoneal Macrophage NO-synthase

Anastasia A. Ligacheva¹✉, Ekaterina I. Gulina², Iuliia V. Shabanova^{2,3}, Evgenia S. Trofimova¹, Sergey. V. Krivoshchekov², Nikita. V. Gurkin², Margarita N. Shurupova⁴, Evgenii Yu. Sherstoboev¹, Marina G. Danilets¹, Mikhail V. Belousov^{2,3}

¹ Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk NRCM, 3, Lenin Av., Tomsk, 634028, Russia

² Siberian State Medical University, 2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050, Russia

³ National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russia

⁴ National Research Tomsk State University, 36, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russia

✉ **Corresponding author:** Anastasia A. Ligacheva. E-mail: vittelli@mail.ru

ORCID: Anastasia A. Ligacheva – <https://orcid.org/0000-0002-3337-1516>; Ekaterina I. Gulina – <https://orcid.org/0000-0002-3234-6845>;

Iuliia V. Shabanova – <https://orcid.org/0000-0002-7248-3262>; Evgenia S. Trofimova – <https://orcid.org/0000-0002-5367-715X>;

Sergey. V. Krivoshchekov – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>; Nikita. V. Gurkin – <https://orcid.org/0000-0002-1481-0421>;

Margarita N. Shurupova – <https://orcid.org/0000-0002-8955-7280>; Evgenii Yu. Sherstoboev – <https://orcid.org/0000-0002-6178-5329>;

Marina G. Danilets – <https://orcid.org/0000-0001-7862-4778>; Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Received: 18.03.2022

Revised: 20.04.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. The nitric oxide molecule is one of the most versatile, multifunctional mediators of biological reactions in the body. NO participates in the formation of innate and specific immunity, the inflammatory process and protection against infectious pathogens. It is known that polysaccharides of higher plants are widely used to activate pro- and anti-inflammatory reactions. Previous studies have shown the promise of a more detailed research in the immunomodulatory properties of plant polysaccharides of the genus *Saussurea* DC, the mechanisms of their immunostimulating and anti-inflammatory action depending on the origin and conditions of extraction.

Aim. The aim of present research was to evaluate the dependence of the affection of the extraction parameters of water-soluble polysaccharides (WSPS) from the aerial parts of *S. salicifolia* (L.) DC., *S. controversa* DC., *S. frolovii* Lebeb. on NO synthase activity and peritoneal macrophages proliferation.

Materials and methods. Chemical methods for the isolation of water-soluble polysaccharides, cultural and biochemical methods for assessing biological activity were used.

Results and discussion. Water-soluble polysaccharides (WSPS) from plants *S. salicifolia* (L.) DC., *S. controversa* DC., *S. frolovii* Ledeb. obtained with different extraction parameters have the ability to enhance production of nitrites antigen-presenting cells in the same way as standard macrophage activator liposaccharide. Polysaccharides from *S. controversa* and *S. frolovii* at acidic extractant are free of endotoxin impurities. All water-soluble polysaccharide samples obtained using neutral and alkaline extractants contain endotoxin impurities. Samples from the *S. controversa* contained this impurity after extraction in an acidic extractant. Polysaccharide samples are not cytotoxic.

Conclusion. It was stated that water-soluble polysaccharides from plants of the *Saussurea* genus using an acidic extractant do not possess cytotoxic properties, do not contain endotoxin impurities and significantly enhance the production of nitric oxide by macrophages. These samples used in a detailed study of the immunomodulatory properties and further development on their basis of new treatment methods various diseases that require correction and regulation of the functional activity of immune cells, including macrophages.

Keywords: plants of the Genus *Saussurea*, water-soluble polysaccharides, nitric oxide, peritoneal macrophages, polymyxin B

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. Mikhail V. Belousov and Evgenii Yu. Sherstoboev substantiated the relevance of this work. Sergey. V. Krivoshchekov, Nikita. V. Gurkin and Margarita N. Shurupova engaged in the procurement and preparation of raw materials. Ekaterina I. Gulina, Iuliia V. Shabanova, Nikita. V. Gurkin and Sergey V. Krivoshchekov synthesized samples and carried out their standardization. Anastasia A. Ligacheva, Evgenia S. Trofimova, Marina G. Danilets, developed an experiment, assessed the biological activity of the studied substances, cultural studies. Anastasia A. Ligacheva, Marina G. Danilets, Ekaterina I. Gulina, participated in data processing. Evgenia S. Trofimova, Marina G. Danilets and Iuliia V. Shabanova performed theoretical calculations. Authors Marina G. Danilets, Evgenia S. Trofimova, Anastasia A. Ligacheva, Mikhail V. Belousov participated in writing the text of the article. All authors discussed results.

Funding. The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research within the framework of scientific project No. 20-315-90016.

Compliance with the principles of ethics. Experiments with the use of laboratory animals were carried out in compliance with the principles of humanity set forth in the directives of the European Community (86/609/EEC) and the Declaration of Helsinki and were approved by the bioethical committee of the NIIFIRM them. E. D. Goldberg, Protocol No. 171052020 dated May 18, 2020.

For citation: Ligacheva A. A., Gulina E. I., Shabanova I. V., Trofimova E. S., Krivoshchekov S. V., Gurkin N. V., Shurupova M. N., Sherstoboev E. Yu., Danilets M. G., Belousov M. V. Effect of water-soluble polysaccharides plant extraction of the *Saussurea* genus on the activity of mice peritoneal macrophage NO-synthase. *Drug development & registration*. 2022;11(2):59–64. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-59-64>

ВВЕДЕНИЕ

Индукцибельная синтаза оксида азота типа 2 (iNOS или NO-синтаза) первоначально описана как фермент, который экспрессируется в активированных макрофагах, генерирует оксид азота (NO) из аминокислоты L-аргинина и тем самым способствует контролю репликации или уничтожению внутриклеточных микробных патогенов [1, 2]. Молекула оксида азота как биологически активное соединение была открыта тридцать лет назад, и с тех пор многочисленными исследованиями доказано, что она является одним из самых универсальных компонентов иммунной системы. Как многофункциональный медиатор, NO участвует в защите организма от инфекционных патогенов, в формировании врожденного и специфического иммунитета, при воспалении [6, 7]. Знание эффектов NO важно не только для понимания формирования иммунного ответа, но и для разработки новых инструментов исследования и приемов лечения различных заболеваний. NO регулирует функциональную активность иммунных клеток, включая антигенпрезентирующие и дендритные клетки, Т-лимфоциты, нейтрофилы и др. [5, 11]. В ответ на стимулирование интерфероном- γ (IFN- γ) и/или лигандами Toll-like-рецепторов (TLR) происходит классическая активация макрофагов (M1), для которых характерен синтез провоспалительных цитокинов, экспрессия iNO-синтазы, продукция реактивных промежуточных соединений азота и кислорода, стимулирование ответа Th1, микробицидная и противоопухолевая активность [6, 10]. TLR млекопитающих служат ключевыми сенсорами распознавания как эндо-, так и экзогенных лигандов, включая патогены, бактерии, вирусы, грибы и паразиты. Известно, растительные полисахариды являются лигандами, которые при взаимодействии с TLR 2-4 способствуют появлению у макрофагов воспалительных свойств M1 и, прежде всего, повышению синтеза оксида азота активированными клетками [3, 8].

В ранее проведенных исследованиях была показана перспективность более детального изучения полисахаридов растений рода *Saussurea* DC. (соссюрея или горькуша) из семейства *Asteraceae* (сложноцветные). Установлено, что наибольшее количество ВРПС содержится в траве соссюреи иволистной (*S. salicifolia* (L.) DC.), соссюреи спорной (*S. controversa* DC.), соссюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.) [12]. Таким образом, представляется актуальным изучение иммуномодулирующих свойств образцов ПС растений этих видов, а именно NO-стимулирующей активности, не зависящей от примеси эндотоксина, и влияние исследуемых образцов на пролиферацию макрофагов.

Целью исследования было изучение влияния способа экстракции ВРПС, выделенных из надземной части соссюреи иволистной (*S. salicifolia* (L.) DC.), соссюреи спорной (*S. controversa* DC.), соссюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.), на активность NO-синтазы и пролиферацию перитонеальных макрофагов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение веществ

Водорастворимые полисахариды выделяли из надземной части соссюреи иволистной (ВРПС SS), соссюреи спорной (ВРПС SC), соссюреи Фролова (ВРПС SF) при использовании экстрагента (вода очищенная, соотношение сырье:экстрагент = 1:50) с различным pH 2, 6 и 10 (3 часа, температура 60 °C). Экстракт фильтровали через бумажный фильтр под вакуумом, упаривали на ротационном испарителе. Полисахариды осаждали 96 % этиловым спиртом (1:4), отстаивали в течение 12 часов при 4 °C, центрифугировали при 2600 об/мин 10 минут. После растворения осадок в воде очищенной с помощью магнитной мешалки, раствор диализовали в течение 48 часов против воды при комнатной температуре. Далее раствор замораживали и подвергали лиофилизации на сушилke SP Scientific Advantage EL-85.

Получение клеток

Макрофаги (МФ) получали из перитонеальной полости мышей линии C57BL/6 (возраст 8–10 недель), выращенных в отделе экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ, используя набор для селекции клеток EasySep™ Biotin Positive Selection Kit (Stem Cell, США) и антитела специфические к макрофагальным рецепторам Anti-Mouse F4/80 Antibody (Stem Cell, США).

Изучение баланса аргинина и цитотоксичности

В активированных макрофагах резко повышается метаболизм L-аргинина, который протекает преимущественно по одному из путей – с помощью NO-синтазы или с помощью аргиназы. Активность NO-синтазы зрелых перитонеальных МФ оценивали по концентрации нитритов в супернатанте клеток после 48-часового культивирования в присутствии ВРПС или ЛПС (серотип O111:B4, Sigma, США) добавляя к нему реактив Грисса (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1:1 и измеряя оптическую плотность раствора на многоканальном спектрофотометре Titertek Multiskan® MCC (LabSystems, Финляндия), длина волны 540 нм. Содержание примеси эндотоксина оценивали при добавлении антибиотика полимиксина Б (50 мкг/мл, Sigma, США) к исследуемым веществам с последующей инкубацией клеток, как описано выше. Цитотоксические свойства изучаемых веществ определяли в классическом тесте МТТ в лизате МФ, добавляя за 4 часа до окончания инкубации 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, США) в конечной концентрации 200 мкг/мл, затем осадок растворяли диметилсульфоксидом (Sigma, США) и измеряли оптическую плотность (ед. опт. плотности), как описано выше.

Статистическая обработка

Полученные в ходе исследования данные обрабатывали с помощью пакета статистических программ Statistica 13.3, используя критерий Шапиро – Уилка для проверки нормальности распределения, однофакторный дисперсионный анализ и критерий Даннета. Результаты представлены в виде $\bar{X} \pm m$, где $\bar{X}$ – среднее значение; m – стандартная ошибка среднего. Уровень статистической значимости различий $p < 0,05$, объем выборки $n = 9$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение влияния различных концентрация ВРПС (2, 20, 60 мкг/мл), выделенных из надземной части сосюреи иволостной, сосюреи спорной и сосюреи Фролова, на пролиферацию перитонеальных макрофагов показало, что кислотность экстрагента, в целом, не влияла на цитотоксические свойства исследуемых образцов (таблица 1).

Выявлено небольшое, в 1,2 раза, ингибирование деления МФ при культивировании с ВРПС SF в максимальной из используемых концентраций. Исходя из полученных результатов, в дальнейшей работе использовали рабочую концентрацию образцов ВРПС – 20 мкг/мл.

Следует отметить, что растительные ВРПС могут содержать бактериальный эндотоксин (липополисахарид, ЛПС), который способен, с одной стороны, оказывать НО-продуцирующее действие, с другой, проявлять нежелательные пирогенные свойства. Для

определения его наличия в образцах ПС широко применяют антибиотик полимиксин Б [10].

Показано, что полисахариды всех исследуемых растений, независимо от используемого экстрагента, усиливали продукцию оксида азота макрофагами (таблица 2) в 19,2–20,1 (ВРПС SS), в 16,4–19,0 (ВРПС SC) и в 14,8–16,8 (ВРПС SF) раз относительно интактного контроля. Стимулирующие свойства ВРПС были сравнимы с влиянием стандартного активатора макрофагов – ЛПС. При этом действие двух образцов ВРПС SC и ВРПС SF, выделенных в кислой среде pH 2, превосходило действие митогена в 1,2 раза.

Концентрация оксида азота в ЛПС-стимулированных супернатантах макрофагов после обработки полимиксином Б снижалась в 9,5–14,3 раз, практически до уровня интактного контроля. При добавлении полимиксина Б к ВРПС SS и ВРПС SF, выделенным в кислой среде (pH 2), концентрация нитритов в культуре МФ не изменялась по сравнению с инкубацией без антибиотика, что свидетельствует об отсутствии в данных образцах примеси эндотоксина. Продукция нитритов при культивировании МФ с ВРПС SS и ВРПС SF, экстрагированными в нейтральной (pH 6) и щелочной (pH 10) среде и обработанными полимиксином Б, достоверно снижалась в 1,3–2,3 раза. Инкубация с блокатором эндотоксина ВРПС SC, экстрагированных всеми тремя способами, приводила к уменьшению ими степени стимуляции продукции оксида азота макрофагами: в 1,4 (pH 2), 2,7 (pH 6) и 2,2 (pH 10) раз. Однако несмотря на значимое снижение, концентрация нитритов в этих условиях не опускалась до значений контроля 1 и была выше его в 14,5–

Таблица 1. Влияние водорастворимых полисахаридов, выделенных в различных условиях из надземной части сосюреи иволостной (*S. salicifolia* (L.) DC.), сосюреи спорной (*S. controversa* DC.) и сосюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.), на пролиферацию перитонеальных макрофагов (ед. опт. плотности, $\times 10^{-3}$) интактных мышей линии C57BL/6 ($\bar{X} \pm m$)

Table 1. Influence of water-soluble polysaccharides isolated under various conditions from the aerial part of *Saussurea salicifolia* (L.) DC., *Saussurea controversa* DC. and *Saussurea frolovii* Ledeb. on the proliferation of peritoneal macrophages (units of optical density, $\times 10^{-3}$) intact mice of strain C57BL/6 ($\bar{X} \pm m$)

Вещество Test sample	Контроль 1 (МФ + Среда) Control 1 (macrophages + cell media)	Контроль 2 (МФ + ЛПС) Control 2 (macrophages + LPS)/4	МФ + ВРПС Macrophages + WSPS								
			pH 2			pH 6			pH 10		
			2 мкг/мл 2 µg/ml	20 мкг/мл 20 µg/ml	60 мкг/мл 60 µg/ml	2 мкг/мл 2 µg/ml	20 мкг/мл 20 µg/ml	60 мкг/мл 60 µg/ml	2 мкг/мл 2 µg/ml	20 мкг/мл 20 µg/ml	60 мкг/мл 60 µg/ml
ВРПС SS WSPS SS	394 ± 9	369 ± 7	370 ± 6	360 ± 6	364 ± 1	380 ± 6	381 ± 3	373 ± 7	400 ± 4●	385 ± 1	386 ± 9
ВРПС SC WSPS SC	379 ± 6	332 ± 6	343 ± 6	345 ± 7	358 ± 5	380 ± 6	381 ± 3	373 ± 7	400 ± 4●	385 ± 1	386 ± 9
ВРПС SF WSPS SF	429 ± 5	375 ± 9	411 ± 8	380 ± 3	397 ± 9	470 ± 1●	455 ± 3●	479 ± 7●	401 ± 2	396 ± 6	357 ± 3*

Примечание. * Различия показателя с контролем 1; ● – различия показателя по различия показателя с контролем 2; уровень статистической значимости различий $p < 0,05$, $n = 9$. Концентрация ЛПС – 0,1 мкг/мл.

Note. * Differences with control 1; ● – differences with control 2; level of statistical significance of differences $p < 0.05$. The concentration LPS – 0.1 µg/ml. $n = 9$.

Таблица 2. Влияние водорастворимых полисахаридов, выделенных в различных условиях из надземной части сосюреи иволыстной (*S. salicifolia* (L.) DC.), сосюреи спорной (*S. controversa* DC.) и сосюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.), на продукцию оксида азота (мкМ) перитонеальными макрофагами интактных мышей линии C57BL/6 в отсутствии и присутствии полимиксина Б ($X \pm m$)

Table 2. Influence of water-soluble polysaccharides isolated under various conditions from the aerial part of *Saussurea salicifolia* (L.) DC., *Saussurea controversa* DC. and *Saussurea frolovii* Ledeb. on production nitric oxide (μM) by peritoneal macrophages of intact C57BL/6 mice in the absence and presence of polymyxin B ($X \pm m$)

Исследуемое вещество Test sample	Контроль 1 (МФ + среда) Control 1 (macrophages + cell media)		Контроль 2 (МФ + ЛПС) Control 2 (macrophages + LPS)		МФ + ВРПС Macrophages + WSPS	
	полимиксин Б polymyxin B		полимиксин Б polymyxin B		полимиксин Б polymyxin B	
	–	+	–	+	–	+
ВРПС SS pH 2 WSPS SS pH 2	2,98 $\pm$ 0,18	2,91 $\pm$ 0,03	54,29 $\pm$ 0,51*	3,79 $\pm$ 0,15▲■	59,79 $\pm$ 0,7*	62,56 $\pm$ 1,18■◆
ВРПС SS pH 6 WSPS SS pH 6					58,29 $\pm$ 1,56*	45,37 $\pm$ 0,95■▲◆
ВРПС SS pH 10 WSPS SS pH 10					57,15 $\pm$ 0,9*	42,29 $\pm$ 1,64■▲◆
ВРПС SC pH 2 WSPS SC pH 2	3,07 $\pm$ 0,30	2,70 $\pm$ 0,08	49,42 $\pm$ 0,51*	4,27 $\pm$ 0,16▲■	58,44 $\pm$ 1,13*●	42,05 $\pm$ 1,31■▲◆
ВРПС SC pH 6 WSPS SC pH 6					50,35 $\pm$ 0,96*	18,75 $\pm$ 0,76■▲◆
ВРПС SC pH 10 WSPS SC pH 10					56,76 $\pm$ 1,65*	26,37 $\pm$ 1,58■▲◆
ВРПС SF pH 2 WSPS SF pH 2	3,87 $\pm$ 0,15	3,8 $\pm$ 0,08	54,64 $\pm$ 0,85*	5,75 $\pm$ 0,13▲■	65,03 $\pm$ 1,81*●	58,73 $\pm$ 2,09■◆
ВРПС SF pH 6 WSPS SF pH 6					57,23 $\pm$ 1,38*	25,06 $\pm$ 1,33■▲◆
ВРПС SF pH 10 WSPS SF pH 10					58,68 $\pm$ 1,26*	44,49 $\pm$ 1,51■▲◆

Примечание. * Различия показателя с контролем 1 без полимиксина; ▲ – различия показателя с инкубацией каждого вещества без полимиксина; ■ – различия показателя с контролем 2 без полимиксина; ● – различия показателя с контролем 1 с полимиксином; ◆ – различия показателя с контролем 2 с полимиксином; уровень статистической значимости различий $p < 0,05$. Концентрация ПС – 20 мкг/мл, полимиксин Б – 50 мкМ, ЛПС – 0,1 мкг/мл. $n = 9$.

Note. * Differences with control 1 without polymyxin; ▲ – differences with incubation of each substance without polymyxin; ■ – differences with control 2 without polymyxin; ● – differences with control 1 with polymyxin; ◆ – differences with control 2 with polymyxin; level of statistical significance of differences $p < 0.05$. The concentration of WSPS – 20 $\mu\text{g/ml}$, polymyxin B – 50 μM , LPS – 0.1 $\mu\text{g/ml}$. $n = 9$.

15,6 (ВРПС SS), в 6,9–11,6 (ВРПС SC) и в 6,5–15,3 (ВРПС SF) раз. Более того NO-активирующие свойства всех образцов ВРПС, обработанных полимиксином Б, были значительно выше митоген-стимулированного контроля, обработанного антибиотиком, в 11,2–16,5 (ВРПС SS), в 4,4–9,8 (ВРПС SC) и в 4,4–10,2 раз (ВРПС SF) в зависимости от кислотности экстрагента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Водорастворимые полисахариды, выделенные из надземной части сосюреи иволыстной (*S. salicifolia* (L.) DC.), сосюреи спорной (*S. controversa* DC.), сосюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.) значительно увеличивали продукцию оксида азота макрофагами и не обладали цитотоксическими свойствами. Два образца (ВРПС SS pH 2 и ВРПС SF pH 2) свободны от примеси эндотоксина. В остальных веществах (ВРПС SS pH 6 и pH 10; ВРПС SC pH 2, pH 6 и pH 10; ВРПС SF pH 2 и pH 10) примеси выявлены в небольшом количестве. Образцы ВРПС без загрязнения ЛПС могут быть использованы

для дальнейшего, более детального изучения иммуномодулирующих свойств и последующей разработки на их основе новых фармакологических субстанций, влияющих на функциональную активность иммунных клеток, включая макрофаги.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akinrinmade O. A., Chetty S., Daramola A. K., Islam M. u., Thepen T., Barth S. CD64: An attractive immunotherapeutic target for M1-type macrophage mediated chronic inflammatory diseases. *Biomedicines*. 2017;5(3):56. DOI: 10.3390/biomedicines5030056.
2. Bogdan C., Rölinghoff M., Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological Reviews*. 2000;173:17–26. DOI: 10.1034/j.1600-065x.2000.917307.
3. Funes S. C., Rios M., Escobar-Vera J., Kalergis A. M. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*. 2018;154(2):186–195. DOI: 10.1111/imm.12910.
4. García-Ortiz A., Serrador J. M. Nitric Oxide Signaling in T Cell-Mediated Immunity. *Trends in Molecular Medicine*. 2018;24(4):412–427. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.02.002.
5. Kumar S., Singh R. K., Bhardwaj T. R. Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;85:182–201. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.11.125.

6. Lind M., Hayes A., Caprnda M., Petrovic D., Rodrigo L., Kruzliak P., Zulli A. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Bio-medicine & Pharmacotherapy*. 2017;93:370–375. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.036.
7. Moncada S., Higgs E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*. 2006;147(1):193–201. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706458 -2.
8. Moreira Lopes T. C., Mosser D. M., Gonçalves R. Macrophage polarization in intestinal inflammation and gut homeostasis. *Inflammation Research*. 2020;69:1163–1172. DOI: 10.1007/s00011-020-01398-y.
9. Schepetkin I. A., Quinn M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*. 2006;6:317–333. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.10.005.
10. Thiriot J. D., Martinez-Martinez Y. B., Endsley J. J., Torres A. G. Hacking the host: exploitation of macrophage polarization by intracellular bacterial pathogens. *Pathogens and Disease*. 2020;78(1). DOI: 10.1093/femspd/ftaa009.
11. Thwe P. M., Amiel E. The role of nitric oxide in metabolic regulation of Dendritic cell immune function. *Cancer Letters*. 2018;412:236–242. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.10.032.
12. Решетов Я. Е., Белоусов М. В., Авдеева Е. Ю., Шурупова М. Н. Сравнительное исследование элементного состава и биологически активных веществ растений рода *Saussurea* DC. флоры Восточной Сибири. *Химия растительного сырья*. 2018;4:205–214. DOI: 10.14258/jcprm.2018043710.
3. Funes S. C., Rios M., Escobar-Vera J., Kalergis A. M. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*. 2018;154(2):186–195. DOI: 10.1111/imm.12910.
4. García-Ortiz A., Serrador J. M. Nitric Oxide Signaling in T Cell-Mediated Immunity. *Trends in Molecular Medicine*. 2018;24(4):412–427. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.02.002.
5. Kumar S., Singh R. K., Bhardwaj T. R. Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;85:182–201. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.11.125.
6. Lind M., Hayes A., Caprnda M., Petrovic D., Rodrigo L., Kruzliak P., Zulli A. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Bio-medicine & Pharmacotherapy*. 2017;93:370–375. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.036.
7. Moncada S., Higgs E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*. 2006;147(1):193–201. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706458 -2.
8. Moreira Lopes T. C., Mosser D. M., Gonçalves R. Macrophage polarization in intestinal inflammation and gut homeostasis. *Inflammation Research*. 2020;69:1163–1172. DOI: 10.1007/s00011-020-01398-y.
9. Schepetkin I. A., Quinn M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*. 2006;6:317–333. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.10.005.
10. Thiriot J. D., Martinez-Martinez Y. B., Endsley J. J., Torres A. G. Hacking the host: exploitation of macrophage polarization by intracellular bacterial pathogens. *Pathogens and Disease*. 2020;78(1). DOI: 10.1093/femspd/ftaa009.
11. Thwe P. M., Amiel E. The role of nitric oxide in metabolic regulation of Dendritic cell immune function. *Cancer Letters*. 2018;412:236–242. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.10.032.
12. Reshetov Y. E., Belousov M. V., Avdeeva E. Yu., Shurupova M. N. Comparative study of the elemental composition and biologically active substances of plants of the genus *Saussurea* DC. flora of Eastern Siberia. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2018;4:205–214. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2018043710.

REFERENCES

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-65-72>
УДК 615.322



Оригинальная статья / Research article

Противомикробная активность соединений полифенольной природы

В. Г. Лужанин¹, А. К. Уэйли², А. О. Понкратова²✉, В. В. Новикова¹, Е. А. Безверхняя³

¹ ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России), 614990, Россия, г. Пермь, ул. Екатерининская, д. 110

² 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. 14А

³ Научно-образовательная лаборатория Химико-фармацевтических исследований ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

✉ Контактное лицо: Понкратова Анастасия Олеговна. E-mail: anastasiya.ponkratova@yandex.ru

ORCID: В. Г. Лужанин – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>; А. К. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; А. О. Понкратова – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>, В. В. Новикова – <https://orcid.org/0000-0003-4475-4421>; Е. А. Безверхняя – <https://orcid.org/0000-0001-7699-5719>.

Статья поступила: 18.03.2022

Статья принята в печать: 21.04.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Возникновение новых штаммов микроорганизмов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), является одной из самых актуальных проблем современной медицины. В настоящее время для борьбы с МЛУ предпринимаются активные попытки получения новых биологически активных веществ природного (микробного, растительного, животного) происхождения. Ранее, коллективом авторов было выделено 32 индивидуальных соединений из надземной части *Iris lactea* Pall., листьев *Rubus chamaemorus* L., побегов *Empetrum nigrum* L., травы *Ononis arvensis* L. и травы *Solidago canadensis* L. и еще 2 соединения синтезированы по ранее опубликованным методикам. Исследование противомикробной активности соединений полифенольной природы представляет собой актуальную задачу для поиска потенциальных средств для борьбы с МЛУ.

Цель. Изучение противомикробной активности индивидуальных выделенных и синтезированных веществ, в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*.

Материалы и методы. Для изучения противомикробной активности использовали субстанции 34 соединений, получены в результате предыдущих исследований, структура которых была установлена с использованием методов ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Противогрибковую и антибактериальную активность соединений определяли микрометодом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде в 96-луночных планшетах в двух повторах. Скрининг противомикробной активности осуществляли в отношении референтных (типовых) штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* NCTC 885-653.

Результаты и обсуждение. В группе флавоноидов, О- и С-гликозидов противогрибковая активность всех исследованных соединений значительно не отличалась, но следует отметить незначительно более выраженную антибактериальную активность С-гликозидов апигенина и О-гликозидов изофлавоноидов в сравнении с О-гликозидами флавонолов. Наибольшую противомикробную активность среди группы халконов проявили непосредственно сами халконы – халкон, 2',4'-дигидрокси-халкон и 2'-гидрокси-4'-метокси-халкон. Среди дигидрохалконов наибольшая противомикробная активность была выявлена у 2',4'-дигидрокси-дигидрохалкона, которая по своей величине сравнима с противомикробной активностью непосредственно самих халконов. Интересная особенность дигидрохалконов заключается в том, что метилирование фенольных гидроксильных групп в 2' и 4' положениях изменяет противомикробную активность в сторону ее уменьшения. Противомикробная активность 9,10-дигидрофенантронов, как и в случае дигидрохалконов, имела зависимость от количества метокси-групп в молекуле. Наименьшие значения МИК проявил 4,7-дигидрокси-2,3-диметокси-9,10-дигидрофенантрен, содержащий всего две метоксигруппы. Для бибензилов наблюдалось обратная зависимость антимикробной активности от количества метоксигрупп – наилучшую активность среди бибензилов против исследуемых штаммов проявил 1-(3-гидрокси-фенил)-2-(3-гидрокси-4,5-диметокси-фенил) этан, содержащий в своей структуре две метоксигруппы.

Заключение. Полифенольные вторичные метаболиты растительного происхождения, относящиеся к исследуемым группам: флавоноиды и О-, С-гликозиды, халконы, 9,10-дигидрофенантроны и бибензилы не проявили значимую противомикробную активность по отношению к изученным штаммам микроорганизмов – *S. aureus* (6538P ATCC), *E. coli* (25922 ATCC) и *C. albicans* (885-653 NCTC). Не смотря на этот факт, была выявлена определенная вариация противомикробной активности в зависимости от структуры исследуемого вещества.

Ключевые слова: противомикробная активность, природные соединения, *Iris lactea*, *Rubus chamaemorus*, *Empetrum nigrum*, *Ononis arvensis*, *Solidago canadensis*

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

Вклад авторов. А. К. Уэйли, А. О. Понкратова, В. В. Новикова, Е. А. Безверхняя выполняли экспериментальную часть и интерпретировали результаты. В. Г. Лужанин осуществлял руководство научным исследованием. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Новикова В. В., Безверхняя Е. А. Противомикробная активность соединений полифенольной природы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):65–72. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-65-72>

Antimicrobial Activity of Polyphenolic Compounds

Vladimir G. Luzhanin¹, Andrei K. Whaley², Anastasiia O. Ponkratova²✉, Valentina V. Novikova¹, Ekaterina A. Bezverkhniaia³

¹ Perm State Pharmaceutical Academy, 110, Ekaterininskaya str., Perm, 614015, Russia

² St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

³ Scientific and Educational Laboratory of Chemical and Pharmaceutical Research of Siberian State Medical University, 2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050, Russia

✉ Corresponding author: Anastasiia O. Ponkratova. E-mail: anastasiya.ponkratova@yandex.ru

© Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Новикова В. В., Безверхняя Е. А., 2022

© Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Novikova V. V., Bezverkhniaia E. A., 2022

ORCID: Vladimir G. Luzhanin – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>; Andrei K. Whaley – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>;
Anastasiiia O. Ponkratova – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; Valentina V. Novikova – <https://orcid.org/0000-0003-4475-4421>;
Ekaterina A. Bezverkhniaia – <https://orcid.org/0000-0001-7699-5719>.

Received: 18.03.2022 Revised: 21.04.2022 Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. The emergence of new strains of microorganisms with multidrug resistance (MDR) is one of the most pressing problems of modern medicine. Currently, to combat MDR, active attempts are being made to obtain new biologically active substances of natural (microbial, plant, animal) origin. Earlier, 32 individual compounds were isolated by the authors from the aerial part of *Iris lactea* Pall., *Rubus chamaemorus* L. leaves, *Empetrum nigrum* L. shoots, *Ononis arvensis* L. aerial part and *Solidago canadensis* L. aerial part, and 2 more compounds were synthesized according to previously published methods. The study of the antimicrobial activity of compounds of these classes is an urgent problem for finding potential agents for combating MDR.

Aim. Studying of the antimicrobial activity of the isolated and synthesized substances in an individual form against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*.

Materials and methods. To test the antimicrobial activity, substances of 34 compounds were used, which were obtained as a result of previous research, the structure of which were established using NMR spectroscopy and high-resolution mass spectrometry. The antifungal and antibacterial activity of the compounds were determined through the micromethod of two-fold serial dilutions in liquid nutrient medium in 96-well plates in duplicate. Screening for antimicrobial activity was carried out against reference (type) strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* NCTC 885-653.

Results and discussion. In the group of flavonoids and O-, C-glycosides, the antifungal activity of all studied compounds did not differ significantly, but it should be noted that the antibacterial activity of apigenin C-glycosides and isoflavonoid O-glycosides was slightly greater in comparison to O-glycosides of flavonols. The greatest antimicrobial activity among the group of chalcones was shown directly by the chalcones themselves – chalcone, 2', 4'-dihydroxychalcone, and 2'-hydroxy-4'-methoxychalcone. Among the dihydrochalcones, the highest antimicrobial activity was found for 2', 4'-dihydroxyhydrochalcone, which was comparable in magnitude to the antimicrobial activity of the chalcones themselves. An interesting feature of dihydrochalcones is that methylation of phenolic hydroxyl groups in the 2' and 4' positions decreases the antimicrobial activity. The antimicrobial activity of 9,10-dihydrophenanthrenes, as in the case of dihydrochalcones, depended on the number of methoxy groups in the molecule. The lowest MIC values were exhibited by 4,7-dihydroxy-2,3-dimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene containing only two methoxy groups. For bibenzyls, an inverse dependence of antimicrobial activity on the number of methoxy groups was observed – the best activity among bibenzyls against the studied strains was shown by 1-(3-hydroxyphenyl)-2-(3-hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)ethane, which contains two methoxy groups in its structure.

Conclusion. Polyphenolic secondary metabolites of plant origin belonging to the studied groups: flavonoids and O-, C-glycosides, chalcones, 9,10-dihydrophenanthrenes and bibenzyls did not show significant antimicrobial activity against the studied strains of microorganisms – *S. aureus* (6538 EP ATCC), *E. coli* (25922 ATCC) and *C. albicans* (885-653 NCTC). Despite this fact, a certain variation in antimicrobial activity was revealed depending on the structure of the tested substances.

Keywords: antimicrobial activity, natural compounds, *Iris lactea*, *Rubus chamaemorus*, *Empetrum nigrum*, *Ononis arvensis*, *Solidago canadensis*

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. Andrei K. Whaley, Anastasiiia O. Ponkratova, Valentina V. Novikova and Ekaterina A. Bezverkhniaia performed the experimental part and processing of the results. Vladimir G. Luzhanin supervised the research. All authors took part in the discussion of the results.

For citation: Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Novikova V. V., Bezverkhniaia E. A. Antimicrobial activity of polyphenolic compounds. *Drug development & registration*. 2022;11(2):65–72. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-65-72>

ВВЕДЕНИЕ

Возникновение новых штаммов микроорганизмов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), является одной из самых актуальных проблем современной медицины. Широко известно, что в последние несколько десятилетий количество новых противомикробных средств, выводимых на рынок, неуклонно снижается, как и количество компаний, занимающихся поиском и разработкой новых противомикробных препаратов. Однако на сегодняшний день инфекционные заболевания представляют собой огромную проблему из-за распространения микробной устойчивости к лекарственным средствам, что обосновывает необходимость разработки новых стратегий поиска антибактериальных препаратов. В настоящее время принимаются активные попытки получения новых

биологически активных веществ природного (микробного, растительного, животного) происхождения. Полифенолы являются обширной группой соединений, включающей в себя, в том числе, такие классы соединений, как флавоноиды, изофлавоноиды, танины, бибензилы, 9,10-дигидрофенантрены, халконы и дигидрохалконы, которые широко представлены в растительном мире [1–4]. В ряде предыдущих исследований было установлено, что полифенолы способны проявлять выраженную противомикробную активность [5–10]. Ранее, коллективом авторов было выделено 32 индивидуальных соединения из наземной части *Iris lactea* Pall., листьев *Rubus chamaemorus* L., побегов *Empetrum nigrum* L., травы *Ononis arvensis* L. и травы *Solidago canadensis* L. [11–17] и еще 2 соединения синтезированы по ранее опубликованным методикам [18]. Выделенные соединения представ-

ляют собой производные бибензила, 9,10-дигидрофенантрена, халкона и дигидрохалкона [11, 12], ксантонов, изофлавоноидов [13], танинов [14, 15], а также флавоноидов и их С- и О-гликозиды [16, 17]. Таким образом, **целью настоящего исследования** является изучение противомикробной активности выделенных в индивидуальном виде соединений, в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения противомикробной активности использовали субстанции соединений, выделенных в предыдущих исследованиях, структура которых была установлена с использованием методов ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения: кверцетин, кверцетин-3-О-β-D-6''-ацетилглюкопиранозид, изорамнетин-3-О-рутинозид, кверцетин-3-О-β-D-глюкуронид, кверцетин-3-О-β-D-2''-галлоилглюкуронид, апигенин-8-С-(4'-О-β-D-глюкопиранозил)-β-D-глюкопиранозид, эмбинин, 2'''-О-ацетилэмбинин, 3'''-О-ацетилэмбинин, 4'''-О-ацетилэмбинин, 2'',3'''-О-диацетилэмбинин, 3'',4'''-О-диацетилэмбинин, 2'',4'''-О-диацетилэмбинин, формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозид, псевдобаптигенин-7-О-β-D-глюкопиранозид, (-)-эпикатехин, 5,7-дигидрокси-6,8-диметилфлаванон, мангиферин, 4-О-α-L-арабинофуранозил эллаговая кислота, 2',4'-дигидрокси-халкон, 2'-гидрокси-4'-метоксихалкон, 2',4'-дигидроксидигидрохалкон, 2'-гидрокси-4'-метоксидигидрохалкон, 4'-гидрокси-2'-метоксидигидрохалкон, 2',4'-диметоксидигидрохалкон, 4,7-дигидрокси-2,3-диметокси-9,10-дигидрофенантрен, 2,3,4-триметокси-5-гидрокси-9,10-дигидрофенантрен, 6-гидрокси-2,3,4-триметокси-9,10-дигидрофенантрен, 2,3,4,7-тетраметокси-9,10-дигидрофенантрен, 1-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)-2-фенилэтан, 1-(3-гидроксифенил)-2-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)этан и 1-(3-гидроксифенил)-2-(3-гидрокси-4,5-диметоксифенил)этан. А также халкон и 4-метоксихалкон, которые были синтезированы по ранее опубликованным методикам.

Исследование антибактериальной и противогрибковой активности

Противогрибковую и антибактериальную активность соединений определяли микрометодом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде в 96-луночных планшетах [19] в двух повторах. Скрининг противомикробной активности осуществляли в отношении референтных (типовых) штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* NCTC 885-653. Концентрация исследуемых соединений в первой лунке ряда разведений в питательной среде составила 500,0 мкг/мл. Для определения антибактериальной активности использовали питательный бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск), для определения противогрибковой активности – бульон Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск). Для приготовления взвеси

дрожжевых культур применяли двухсуточные культуры, выращенные на агаре Сабуро. Для определения антибактериальной активности использовали суточные культуры, выращенные на питательном агаре. Концентрация микробных клеток в опыте составила $2-5 \times 10^5$ КОЕ/мл. В качестве положительного контроля использовали питательную среду с внесенной исследуемой культурой. В качестве отрицательного контроля использовали интактную питательную среду. Посевы инкубировали в термостате при температуре 35 ± 2 °C. Оценку роста микроорганизмов проводили визуально через 20–24 ч инкубирования. В качестве значения МИК (минимальной ингибирующей концентрации) принимали концентрацию соединения в последней прозрачной лунке серии разведения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из 34 исследуемых индивидуальных соединений 32 представлены различными полифенольными вторичными метаболитами растительного происхождения, в то время как оставшиеся 2 соединения относятся к их синтетическим аналогам.

Исследуемые соединения объединялись в группы в зависимости от своего химического строения: флавоноиды и их О- и С-гликозиды (19), халконы (8), 9,10-дигидрофенантроны (4) и бибензилы (3).

Флавоноиды и О-, С-гликозиды

В данную группу соединений были включены флавоноидные агликоны (3), О-гликозиды флавоноидов (6), С-гликозиды флавоноидов (8), С-гликозид ксантона (1) и О-гликозид эллаговой кислоты (1). Противомикробная активность данных соединений представлена в таблице 1.

К флавоноидным О-гликозидам были отнесены следующие индивидуальные соединения: кверцетин-3-О-β-D-6''-ацетилглюкопиранозид, изорамнетин-3-О-рутинозид, кверцетин-3-О-β-D-глюкуронид, кверцетин-3-О-β-D-2''-галлоилглюкуронид, формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозид и псевдобаптигенин-7-О-β-D-глюкопиранозид.

Среди них, наименьшую активность по отношению к исследованным штаммам бактерий, как грамположительным (Грам (+)), так и к грамотрицательным (Грам (-)), проявили производные кверцетина и изорамнетина – кверцетин-3-О-β-D-6''-ацетилглюкопиранозид, кверцетин-3-О-β-D-2''-галлоилглюкуронид и изорамнетин-3-О-рутинозид. При этом, сравнительно большую активность по отношению к *E. coli* показал кверцетин-3-О-β-D-глюкуронид, хотя его 2''-галлоил производное такой особенностью не отличалось. Данная активность потенциально может быть обеспечена более полярным характером данного соединения и его значимой растворимостью в воде, в сравнении с вышеперечисленными флавоноидными О-гликозидами.

Таблица 1. Противомикробная активность флавоноидов и О-, С-гликозидов

Table 1. Antimicrobial activity of flavonoids and O-, C-glycosides

№	Названия соединений Name of compounds	Наименование вида/штамма микроорганизма Name of microorganism species/strain	МИК, мкг/мл MIC, µg/ml
1	Кверцетин Quercetin	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	500/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	500/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
2	Кверцетин-3-О-β-D-6''-ацетилглюкопиранозид Quercetin-3-O-β-D-6''-acetylglucopyranoside	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	500/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	500/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
3	Изорамнетин-3-О-рутинозид Isorhamnetin-3-O-rutinoside	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	500/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	500/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
4	Кверцетин-3-О-β-D-глюкуронид Quercetin-3-O-β-D-glucuronide	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	500/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/250
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
5	Кверцетин-3-О-β-D-2''-галлоилглюкуронид Quercetin-3-O-β-D-2''-galloylglucuronide	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	500/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	500/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
6	Апигенин-8-С-(4'-О-β-D-глюкопиранозил)-β-D-глюкопиранозид Apigenin-8-C-(4'-O-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	500/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	500/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
7	Эмбинин Embinin	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/250
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	125/250
8	2'''-О-ацетилэмбинин 2'''-O-acetylembinin	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	500/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
9	3'''-О-ацетилэмбинин 3'''-O-acetylembinin	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	500/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
10	4'''-О-ацетилэмбинин 4'''-O-acetylembinin	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	500/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
11	2''',3'''-О-диацетилэмбинин 2''',3'''-O-diacetylembinin	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/500
12	3''',4'''-О-диацетилэмбинин 3''',4'''-O-diacetylembinin	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/250
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
13	2''',4'''-О-диацетилэмбинин 2''',4'''-O-diacetylembinin	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
14	Формононетин-7-О-β-D-глюкопиранозид Formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
15	Псевдобапигенин-7-О-β-D-глюкопиранозид Pseudobaptigenin-7-O-β-D-glucopyranoside	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	500/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/250
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
16	(-)-Эпикатехин (-)-Epicatechin	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	500/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/250
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250

№	Названия соединений Name of compounds	Наименование вида/штамма микроорганизма Name of microorganism species/strain	МИК, мкг/мл MIC, µg/ml
17	5,7-дигидрокси-6,8-диметилфлаванон 5,7-dihydroxy-6,8-dimethylflavanon	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	500/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	125/250
18	Мангиферин Mangiferin	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	500/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
19	4-O-α-L-арабинофуранозил эллаговая кислота 4-O-α-L-arabinofuranosyl ellagic acid	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250

Несколько меньшие значения МИК по отношению к Грам (+) и Грам (-) бактериям имели О-гликозиды изофлавоноидов: формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозид и псевдобапигенин-7-О-β-D-глюкопиранозид. Данное явление объясняется сравнительно большей антибактериальной активностью характерной для изофлавоноидов по отношению к типичным производным флавонолов. При этом, несмотря на, в некой степени, отличающиеся антибактериальные свойства данных соединений, их противогрибковая активность заметно не отличалась от остальных флавоноидных О-гликозидов.

К флавоноидным С-гликозидам были отнесены следующие индивидуальные соединения: эмбинин, 2'''-О-ацетилэмбинин, 3'''-О-ацетилэмбинин, 4'''-О-ацетилэмбинин, 2''',3'''-О-диацетилэмбинин, 3''',4'''-О-диацетилэмбинин, 2''',4'''-О-диацетилэмбинин и апигенин-8-С-(4'-О-β-D-глюкопиранозил)-β-D-глюкопиранозид. Все перечисленные соединения являются С-гликозидами апигенина. Между собой данные соединения не отличались выраженностью антимикробного действия, но в сравнении с флавоноидными О-гликозидами для флавоноидных С-гликозидов активность по отношению к референтным штаммам бактерий была более высокая.

К агликонам флавоноидов были отнесены: кверцетин, (-)-эпикатехин и 5,7-дигидрокси-6,8-диметилфлаванон. По отношению к *S. aureus* и *E. coli* данные соединения не проявили заметную активность в сравнении с флавоноидными О- и С-гликозидами. Но стоит отметить потенциально большую активность 5,7-дигидрокси-6,8-диметилфлаванона в отношении *C. albicans*.

К производным С-гликозидов ксантонов был отнесен мангиферин. Несмотря на то, что данное вещество не относится к флавоноидам, его активность имеет схожий профиль с С-гликозидами флавонов.

К таннинам была отнесена 4-О-α-L-арабинофуранозилэллаговая кислота. Противомикробная активность данного соединения сравнима с противомикробной активностью исследованных О-гликозидов изофлавоноидов.

Противогрибковая активность всех исследованных соединений в данной группе значительно не отличалась, за возможным исключением 5,7-дигидрокси-6,8-диметилфлаванона. В целом следует отметить незначительно более выраженную антибактериальную активность С-гликозидов апигенина и О-гликозидов изофлавоноидов в сравнении с О-гликозидами флавонолов.

Халконы, 9,10-дигидрофенантрены и бибензилы

В данную группу соединений были включены халконы (8), 9,10-дигидрофенантрены (4) и бибензилы (3). Особенность данных полифенолов заключается в том, что они представляют собой сравнительно малополярные соединения, растворимые преимущественно в органических растворителях. Противомикробная активность данных соединений представлена в таблице 2.

Исследованные нами халконы в зависимости от особенностей своей структуры подразделяются на три группы – непосредственно сами халконы, дигидрохалконы и ретрохалконы. К самим халконам относятся – халкон, 2',4'-дигидроксихалкон и 2'-гидрокси-4'-метоксихалкон. К дигидрохалконам относятся 2',4'-дигидрокси-дигидрохалкон, 2'-гидрокси-4'-метоксидигидрохалкон, 4'-гидрокси-2'-метоксидигидрохалкон и 2',4'-диметоксидигидрохалкон. К ретрохалконам относится 4-метоксихалкон.

Наибольшую противомикробную активность среди группы халконов проявили непосредственно сами халконы – халкон, 2',4'-дигидроксихалкон и 2'-гидрокси-4'-метоксихалкон. По всему видимому, непосредственно халконовое ядро ответственно за проявленную антимикробную активность. На основании полученных данных определяется зависимость от наличия заместителей – гидроксид- и метоксигруппы в кольце А, вероятно, потенцируют противомикробную активность, в то время как заместители – метоксигруппы в кольце В, на примере ретрохалконов, на проявляемую противомикробную активность значимо не влияют.

Таблица 2. Противомикробная активность халконов, 9,10-дигидрофенантронов и бибензилов

Table 2. Antimicrobial activity of chalcones, 9,10-dihydrophenanthrenes and bibenzyls

№	Названия соединений Name of compounds	Наименование вида/штамма микроор- ганизма Name of microorganism species/strain	МИК, мкг/мл MIC, µg/ml
1	2',4'-дигидроксихалкон 2',4'-dihydroxychalcone	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	125/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/250
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
2	2'-гидрокси-4'-метоксихалкон 2'-hydroxy-4'-methoxychalcone	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/250
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
3	2',4'-дигидроксидигидрохалкон 2',4'-dihydroxydihydrochalcone	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/250
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
4	2'-гидрокси-4'-метоксидигидрохалкон 2'-hydroxy-4'-methoxydihydrochalcone	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	500/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	500/500
5	4'-гидрокси-2'-метоксидигидрохалкон 4'-hydroxy-2'-methoxydihydrochalcone	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	500/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	500/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
6	2',4'-диметоксидигидрохалкон 2',4'-dimethoxydihydrochalcone	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	500/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	500/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
7	Халкон Chalcone	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
8	4-метоксихалкон 4-methoxychalcone	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
9	4,7-дигидрокси-2,3-диметокси-9,10-дигидрофенантрен 4,7-dihydroxy-2,3-dimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/250
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
10	2,3,4-триметокси-5-гидрокси-9,10-дигидрофенантрен 2,3,4-trimethoxy-5-hydroxy-9,10-dihydrophenanthrene	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	500/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/250
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
11	6-гидрокси-2,3,4-триметокси-9,10-дигидрофенантрен 6-hydroxy-2,3,4-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	500/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
12	2,3,4,7-тетраметокси-9,10-дигидрофенантрен 2,3,4,7-tetramethoxy-9,10-dihydrophenanthrene	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	500/500
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/250
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
13	1-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)-2-фенилэтан 1-(3,5-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-2-phenylethane	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
14	1-(3-гидроксифенил)-2-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)этан 1-(3-hydroxyphenyl)-2-(3,5-dihydroxy-4-methoxyphenyl)ethane	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	500/500
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250
15	1-(3-гидроксифенил)-2-(3-гидрокси-4,5-диметоксифенил)этан 1-(3-hydroxyphenyl)-2-(3-hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)ethane	<i>S. aureus</i> (6538P ATCC)	250/250
		<i>E. coli</i> (25922 ATCC)	250/250
		<i>C. albicans</i> (885-653 NCTC)	250/250

Среди дигидрохалконов наибольшая противомикробная активность была выявлена у 2',4'-дигидроксидигидрохалкона, которая по своей величине сравнима с противомикробной активностью непосредственно самих халконов. Интересная особенность дигидрохалконов заключается в том, что метилирование фе-

нольных гидроксильных групп в 2' и 4' положениях изменяет противомикробную активность в сторону ее уменьшения. Например, метилирование 2',4'-дигидроксидигидрохалкона в 2' положении с образованием 4'-гидрокси-2'-метоксидигидрохалкона увеличивает МИК для культур *E. coli* и *S. aureus*, в то время как

метилование 2',4'-дигидроксидигидрохалкона в 4' положении с образованием 2'-гидрокси-4'-метоксидигидрохалкона увеличивает МИК для культур *E. coli* и *C. albicans*. Одновременное метилирование в 2' и 4' положениях с образованием 2',4'-диметоксидигидрохалкона также увеличивает МИК для культур *E. coli* и *S. aureus*.

К исследованным нами 9,10-дигидрофенантренам относятся 4,7-дигидрокси-2,3-диметокси-9,10-дигидрофенантрен, 2,3,4-триметокси-5-гидрокси-9,10-дигидрофенантрен, 6-гидрокси-2,3,4-триметокси-9,10-дигидрофенантрен и 2,3,4,7-тетраметокси-9,10-дигидрофенантренов, как и в случае дигидрохалконов, имела зависимость от количества метоксигрупп в молекуле. Наименьшие значения МИК проявил 4,7-дигидрокси-2,3-диметокси-9,10-дигидрофенантрен, содержащий всего две метоксигруппы. Все остальные 9,10-дигидрофенантрены с тремя метоксигруппами – 2,3,4-триметокси-5-гидрокси-9,10-дигидрофенантрен, 6-гидрокси-2,3,4-триметокси-9,10-дигидрофенантрен и с четырьмя метоксигруппами – 2,3,4,7-тетраметокси-9,10-дигидрофенантрен, имели сравнительно меньшее противомикробное действие.

В группу бибензилов входят 1-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)-2-фенилэтан, 1-(3-гидроксифенил)-2-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)этан и 1-(3-гидроксифенил)-2-(3-гидрокси-4,5-диметоксифенил)этан. Для данного класса соединений наблюдалось обратная зависимость антимикробной активности от количества метоксигрупп – наилучшую активность среди бибензилов против исследуемых штаммов проявил 1-(3-гидроксифенил)-2-(3-гидрокси-4,5-диметоксифенил)этан, содержащий в своей структуре две метоксигруппы. Наличие в структуре всего одной метоксигруппы как у 1-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)-2-фенилэтана и 1-(3-гидроксифенил)-2-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)этана уменьшает активность против *E. coli*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полифенольные вторичные метаболиты растительного происхождения, относящиеся к исследуемым группам: флавоноиды и О-, С-гликозиды, халконы, 9,10-дигидрофенантрены и бибензилы не проявили значимую противомикробную активность по отношению к изученным штаммам микроорганизмов – *S. aureus* (6538P ATCC), *E. coli* (25922 ATCC) и *C. albicans* (885-653 NCTC). Не смотря на этот факт, была выявлена определенная вариация противомикробной активности в зависимости от структуры исследуемого вещества. Для группы флавоноидов и О-, С-гликозидов наибольшую сравнительную противомикробную активность проявили С-гликозиды флавонов и изофлавоноиды. Для соединений халконовой природы и 9,10-дигидрофенантренов метилирование

фенольных гидроксильных групп приводило к уменьшению противомикробной активности, в то время как для соединений бибензильной природы метилирование повышало противомикробную активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Уэйли А. К., Понкратова А. О., Теслов Л. С., Лужанин В. Г. Обзор вторичных метаболитов морозники и их биологической активности. *Медико-фармацевтический журнал Пульс*. 2020;22(7):50–59. DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2020-22-7-50-59.
2. Лужанин В. Г., Понкратова А. О., Уэйли А. К., Гришукова Е. А., Яковлев Г. П. Стальник полевой (*Ononis arvensis* L.) – перспективный источник веществ с различной биологической активностью. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2020;23(11):3–9. DOI: 10.29296/25877313-2020-11-01.
3. Bezverkhniia E. A., Ermilova E. V., Kadyrova T. V., Krasnov E. A., Brazovskii K. S., Ponkratova A. O., Luzhanin V. G., Belousov M. V. Phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology of the genus *Empetrum*: a review. *Advances in Traditional Medicine*. 2021;1–14. DOI: 10.1007/s13596-021-00612-4.
4. Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Жохова Е. В., Зингалюк М. А., Прякина Н. И. Касатик молочного-белый (*Iris lactea* Pall.) – перспективный источник биологически активных веществ. *Химия растительного сырья*. 2021;3:5–17. DOI: 10.14258/jcprm.2021038890.
5. Górniak I., Bartoszewski R., Królczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry reviews*. 2019;18:241–272. DOI: 10.1007/s11101-018-9591-z.
6. Yuan G., Guan Y., Yi H., Lai S., Sun Y., Cao S. Antibacterial activity and mechanism of plant flavonoids to gram-positive bacteria predicted from their lipophilicities. *Scientific reports*. 2021;11:10471. DOI: 10.1038/s41598-021-90035-7.
7. Boger D. L., Mitscher L. A., Mullican M. D., Drake S. D., Kito S. P. Antimicrobial and antitumor properties of 9,10-dihydrophenanthrenes: structure activity studies on juncosol. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1985;28(10):1543–1547. DOI: 10.1021/jm00148a031.
8. Jiang S., Wan K., Lou H. Y., Yi P., Zhang N., Zhou M., Song Z. Q., Wang W., Wu M. K., Pan W. D. Antibacterial bibenzyl derivatives from the tubers of *Bletilla striata*. *Phytochemistry*. 2019;162:216–223. DOI: 10.1016/j.phytochem.2019.03.022.
9. Cretton S., Oyarzún A., Righi D., Sahib L., Kaiser M., Christen P., Fajardo V. A new antifungal and antiprotozoal bibenzyl derivative from *Gavilea lutea*. *Natural Product Research*. 2017;32(6):695–701. DOI: 10.1080/14786419.2017.1338287.
10. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991;30(12):3875–3883. DOI: 10.1016/0031-9422(91)83426-1.
11. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Balabas O. A., Smirnov S. N., Proksch P., Luzhanin V. G. A new bibenzyl and 9,10-dihydrophenanthrene derivative from aerial parts of crowberry (*Empetrum nigrum* L.). *Phytochemistry letters*. 2021;42:15–17. DOI: 10.1016/j.phytol.2021.01.001.
12. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Proksch P., Luzhanin V. G. A new dimethoxy dihydrochalcone isolated from the shoots of *Empetrum nigrum* L. *Natural Products Research*. 2021;1–6. DOI: 10.1080/14786419.2021.1920584.
13. Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Гришукова Е. А., Сулоев И. С., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б. Выделение индивидуальных соединений из надземной части стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):83–89. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
14. Уэйли А. К., Понкратова А. О., Орлова А. А., Серебряков Е. Б., Смирнов С. Н., Прох П., Ионов Н. С., Порошков В. В., Лужанин В. Г. Фитохимический анализ вторичных метаболитов полифенольной природы в листьях морозники обыкновенной (*Rubus chamaemorus* L.). *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(3):22–27. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-3-22-27.
15. Понкратова А. О., Уэйли А. К., Орлова А. А., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б., Лужанин В. Г. Выделение и установление структуры трех димерных проантоцианидинов типа А

- из надземной части *Empetrum nigrum* L. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(2):80–86. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86.
16. Уэйли А. К., Понкратова А. О., Орлова А. А., Серебряков Е. Б., Селиванов С. И., Кривошеков С. В., Белоусов М. В., Прокш П., Лужанин В. Г. Анализ С-гликозидов флавонов и продуктов ступенчатого гидролиза из ацетатов в листья *Rubus Chamaemorus* L. Химия растительного сырья. 2021;2:257–265. DOI: 10.14258/jcprm.2021029185s.
17. Whaley A. K., Ebrahim W., El-Neketi M., Ancheeva E. New acetylated flavone C-glycosides from *Iris lactea*. *Tetrahedron Letters*. 2017;58(22):2171–2173. DOI: 10.1016/j.tetlet.2017.04.080.
18. Kohler E. P., Chadwell H. M. Benzalacetophenone. *Organic syntheses*. 1922;2:1. DOI: 10.15227/orgsyn.002.0001.
19. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
14. Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Serebryakov E. B., Smirnov S. N., Proksh P., Ionov N. S., Poroikov V. V., Luzhanin V. G. Phytochemical analysis of polyphenol secondary metabolites in the leaves of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55(3):22–27. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-3-22-27.
15. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Luzhanin V. G. Isolation and structure elucidation of three dimeric A-type proanthocyanidins from *Empetrum nigrum* L. *Drug development & registration*. 2021;10(2):80–86. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86.
16. Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Serebryakov E. B., Selivanov S. I., Krivoshchekov S. V., Belousov M. V., Proksh P., Luzhanin V. G. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*. 2021;2:257–265. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2021029185.
17. Whaley A. K., Ebrahim W., El-Neketi M., Ancheeva E. New acetylated flavone C-glycosides from *Iris lactea*. *Tetrahedron Letters*. 2017;58(22):2171–2173. DOI: 10.1016/j.tetlet.2017.04.080.
18. Kohler E. P., Chadwell H. M. Benzalacetophenone. *Organic syntheses*. 1922;2:1. DOI: 10.15227/orgsyn.002.0001.
19. Mironov A. N. Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal products. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (In Russ.)
- ## REFERENCES
1. Whaley A. K., Ponkratova A. O., Teslov L. S., Luzhanin V. G. Review of cloudberry secondary metabolites and their biological activity. *Medical & pharmaceutical journal «Pulse»*. 2020;22(7):50–59. (In Russ.) DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2020-22-7-50-59.
2. Luzhanin V. G., Ponkratova A. O., Whaley A. K., Grishukova E. A., Yakovlev G. P. Field restharrow (*Ononis arvensis* L.) – promising source of substances with different biological activity. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2020;23(11):46–52. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2020-11-00.
3. Bezverkhniia E. A., Ermilova E. V., Kadyrova T. V., Krasnov E. A., Brazovskii K. S., Ponkratova A. O., Luzhanin V. G., Belousov M. V. Phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology of the genus *Empetrum*: a review. *Advances in Traditional Medicine*. 2021:1–14. DOI: 10.1007/s13596-021-00612-4.
4. Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Zhokhova E. V., Zingalyuk M. A., Pryaknina N. I. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2021;3:5–17. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2021038890.
5. Górniak I., Bartoszewski R., Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry reviews*. 2019;18:241–272. DOI: 10.1007/s11101-018-9591-z.
6. Yuan G., Guan Y., Yi H., Lai S., Sun Y., Cao S. Antibacterial activity and mechanism of plant flavonoids to gram-positive bacteria predicted from their lipophilicities. *Scientific reports*. 2021;11:10471. DOI: 10.1038/s41598-021-90035-7.
7. Boger D. L., Mitscher L. A., Mullican M. D., Drake S. D., Kito P. Antimicrobial and antitumor properties of 9,10-dihydrophe-nanthrenes: structure activity studies on juncusol. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1985;28(10):1543–1547. DOI: 10.1021/jm00148a031.
8. Jiang S., Wan K., Lou H. Y., Yi P., Zhang N., Zhou M., Song Z. Q., Wang W., Wu M. K., Pan W. D. Antibacterial bibenzyl derivatives from the tubers of *Bletilla striata*. *Phytochemistry*. 2019;162:216–223. DOI: 10.1016/j.phytochem.2019.03.022.
9. Cretton S., Oyarzún A., Righi D., Sahib L., Kaiser M., Christen P., Fajardo V. A new antifungal and antiprotozoal bibenzyl derivative from *Gavilea lutea*. *Natural Product Research*. 2017;32(6):695–701. DOI: 10.1080/14786419.2017.1338287.
10. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991;30(12):3875–3883. DOI: 10.1016/0031-9422(91)83426-l.
11. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Balabas O. A., Smirnov S. N., Proksh P., Luzhanin V. G. A new bibenzyl and 9,10-dihydrophe-nanthrene derivative from aerial parts of crowberry (*Empetrum nigrum* L.). *Phytochemistry letters*. 2021;42:15–17. DOI: 10.1016/j.phytol.2021.01.001.
12. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Proksh P., Luzhanin V. G. A new dimethoxy dihydro-chalcone isolated from the shoots of *Empetrum nigrum* L. *Natural Products Research*. 2021:1–6. DOI: 10.1080/14786419.2021.1920584.
13. Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Grishukova E. A., Suloev I. S., Smirnov S. N., Serebryakov E. B. Isolation of individual compounds from the terrestrial parts of *Ononis arvensis* L. and *Solidago canadensis* L. *Drug development & registration*. 2021;10(1):83–89. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.



ПЛАТИНОВАЯ УНЦИЯ
CONFERENCE



ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«ОБЕСПЕЧЕНИЕ ПОТРЕБНОСТЕЙ
НАЦИОНАЛЬНОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ.
ЛЕТО-2022»

8-9 ИЮНЯ 2022 ГОДА

ОТЕЛЬ «БАЛЧУГ КЕМПИНСКИ»
МОСКВА, УЛ. БАЛЧУГ, Д. 1



UNCIA-CONFERENCE.RU

КОНТАКТЫ:

+7 (495) 419 08 68,

+7 (926) 440 25 69

uncia-conference@kstgroup.ru

Разработка и изучение ушных капель с бактериофагами для лечения инфекционных отитов, осложненных *P. aeruginosa*

Е. О. Бахрушина¹✉, М. Н. Анурова^{1,2}, С. С. Бочкарева², А. М. Воробьев², Ю. О. Щербина¹,
М. А. Пасивкина^{1,2}, Л. О. Крехтунова¹, Н. Б. Демина¹, А. В. Алешкин²

¹ ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Институт фармации имени А. П. Нелюбина, 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 96, корп. 1

² ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Россия, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

✉ Контактное лицо: Бахрушина Елена Олеговна. E-mail: bachrauschenh@mail.ru

ORCID: Е. О. Бахрушина – <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>; М. Н. Анурова – <https://orcid.org/0000-0002-7649-9616>; С. С. Бочкарева – <https://orcid.org/0000-0002-4751-7416>;
А. М. Воробьев – <https://orcid.org/0000-0003-4724-2464>; Ю. О. Щербина – <https://orcid.org/0000-0001-5079-7669>; М. А. Пасивкина – <https://orcid.org/0000-0001-6223-1347>;
Л. О. Крехтунова – <https://orcid.org/0000-0002-2893-3748>; Н. Б. Демина – <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; А. В. Алешкин – <https://orcid.org/0000-0002-0532-1378>.

Статья поступила: 09.11.2021

Статья принята в печать: 10.03.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Инфекционные отиты наружного и среднего уха способны вызывать потерю слуха, что существенно снижает качество жизни пациентов. Основными возбудителями острого бактериального отита являются *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Статья посвящена разработке и изучению новой лекарственной формы для лечения инфекционных отитов, содержащей бактериофаги, лизирующие бактериальные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*. Препараты бактериофагов могут быть альтернативой препаратам антибиотиков местного действия, использующихся в оториноларингологической практике по всему миру. В качестве перспективной лекарственной формы для инстилляции в ушной проход рассматривались ушные капли.

Цель. Целью работы является разработка лекарственной формы бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa* для местного лечения инфекционных отитов.

Материалы и методы. Действующими веществами разрабатываемого препарата являются бактериофаги, лизирующие бактериальные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*: PA5 и PA10, полученные методом выращивания на плотной питательной среде в матрасах с последующей стерилизующей фильтрацией через мембранный фильтр (0,22 мкм) и освобождением от эндотоксина на хроматографической колонке. Для получения экспериментальных составов использовались эксципиенты, не вызывающие падения титра бактериофагов – растворитель вода очищенная, модификаторы вязкости глицерин (ООО ТД «ХИММЕД», Россия) и смесь макрогола 6 и глицерил каприлокапрата марки Softigen® 767 (CREMER, Германия), антиоксидант этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), консерванты нипагин и нипазол. Полученные образцы стандартизовали по фармакопейным показателям, рекомендуемым для лекарственной формы капли: плотность, pH, вязкость. Для всех экспериментальных составов изучали стабильность титра бактериофагов по методу Грация в течение 12 месяцев, также исследовали местораздражающее и системное действие на пяти кроликах самцах породы шиншилла.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований получено четыре экспериментальных состава ушных капель с коктейлем бактериофагов PA5 и PA10. Оптимальным технологическими характеристиками обладал состав, содержащий глицерин в качестве модификатора вязкости в концентрации 10,0 %. Для этого образца установлены стабильность титра бактериофагов PA5 и PA10, отсутствие местнораздражающего и системного действия.

Заключение. По итогам проведенных исследований лекарственная форма может быть рекомендована к проведению доклинических исследований, а после проведения дополнительных испытаний на других бактериофагах – для применения в персонализированной фаготерапии.

Ключевые слова: ушные капли, бактериофаги, инфекционный отит, *Pseudomonas aeruginosa*, персонализированная терапия

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

Вклад авторов. Е. О. Бахрушина, М. Н. Анурова, А. М. Воробьев и Ю. О. Щербина придумали и разработали эксперимент. С. С. Бочкарева и Ю. О. Щербина провели исследования местнораздражающего и системного действия на животных. А. М. Воробьев, М. А. Пасивкина и Л. О. Крехтунова проводили микробиологические исследования *in vitro*. М. А. Пасивкина и Л. О. Крехтунова участвовали в обработке данных. Е. О. Бахрушина проводила теоретические расчеты. Е. О. Бахрушина, М. Н. Анурова и А. М. Воробьев участвовали в написании текста статьи. Н. Б. Демина и А. В. Алешкин участвовали в рецензировании и одобрении статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Бахрушина Е. О., Анурова М. Н., Бочкарева С. С., Воробьев А. М., Щербина Ю. О., Пасивкина М. А., Крехтунова Л. О., Демина Н. Б., Алешкин А. В. Разработка и изучение ушных капель с бактериофагами для лечения инфекционных отитов, осложненных *P. aeruginosa*. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(2):74–78. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-74-78>

© Бахрушина Е. О., Анурова М. Н., Бочкарева С. С., Воробьев А. М., Щербина Ю. О., Пасивкина М. А., Крехтунова Л. О., Демина Н. Б., Алешкин А. В., 2022

© Bakhrushina E. O., Anurova M. N., Bochkareva S. S., Vorobev A. M., Shcherbina Yu. O., Pasivkina M. A., Krekhtunova L. O., Demina N. B., Aleshkin A. V., 2022

Development and Study of Bacteriophage-containing Dosage Form for the Treatment of the Outer Ear Infections

Elena O. Bakhrushina¹✉, Maria N. Anurova^{1,2}, Svatlana S. Bochkareva², Alexey M. Vorobev², Yulia O. Shcherbina¹, Maria A. Pasivkina¹, Lika O. Krekhtunova¹, Natalia B. Demina¹, Andrey V. Aleshkin²

¹ I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), A. P. Nelyubin Institute of Pharmacy, 96/1, Vernadsky av., Moscow 119571, Russia

² FBIS MRIEM of G. N. Gabrichesky, 10, Admirala Makarova str. Moscow, 125212, Russia

✉ Corresponding author: Elena O. Bakhrushina. E-mail: bachrauschen@mail.ru

ORCID: Elena O. Bakhrushina – <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>; Maria N. Anurova – <https://orcid.org/0000-0002-7649-9616>;

Svatlana S. Bochkareva – <https://orcid.org/0000-0002-4751-7416>; Alexey M. Vorobev – <https://orcid.org/0000-0003-4724-2464>;

Yulia O. Shcherbina – <https://orcid.org/0000-0001-5079-7669>; Maria A. Pasivkina – <https://orcid.org/0000-0001-6223-1347>;

Lika O. Krekhtunova – <https://orcid.org/0000-0002-2893-3748>; Natalia B. Demina – <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; Andrey V. Aleshkin – <https://orcid.org/0000-0002-0532-1378>.

Received: 09.11.2021

Revised: 10.03.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. Infectious otitis externa and middle ear can cause hearing loss, which significantly reduces the quality of life of patients. The main causative agents of acute bacterial otitis media are *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. This article is devoted to the development and study of a novel dosage form for treatment of infectious diseases of the external ear containing bacteriophages that lyse bacterial strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Ear drops were considered as a promising dosage form for instillation into the ear canal.

Aim. The aim of the work is to develop a dosage form of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages for the local treatment of infectious otitis media.

Materials and Methods. The active substances of the developed drug are bacteriophages that lyse bacterial strains of *Pseudomonas aeruginosa*: PA5 and PA10, which were obtained by growing on a solid growth medium in mattress flasks with subsequent sterilizing filtration through a membrane filter (0,22 µm) and elimination of endotoxins on a chromatographic column. To obtain experimental compositions, excipients that do not cause a drop in the titer of bacteriophages were used – purified water as the solvent, viscosity modifiers: glycerol (CHIMMED, Russia) and a mix of macrogol 6 and glyceryl caprilcaprate brand Softigen 767 (Cremer, Germany), antioxidant Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), preservatives nipagin and nipazole. The obtained samples were standardized according to pharmacopoeial indicators, recommended for the dosage form "drops" – density, pH, viscosity. For all experimental compositions, the stability of the titer of bacteriophages was studied by the Gratia method for 6 months. The local irritation and systemic effects were also studied on five chinchilla male rabbits.

Results and discussion. As a result of the conducted research, four experimental compositions of ear drops with a cocktail of bacteriophages PA5 and PA10 were obtained. The optimal technological characteristics were observed in the composition containing glycerol as a viscosity modifier at a concentration of 10,0 %. For optimal composition, the stability of the bacteriophages cocktail titer, local irritating and systemic effects were analyzed. The study revealed stability of the bacteriophages PA5 and PA10 titers in the composition of dosage form, and absence of local irritating and systemic effects of ear drops.

Conclusion. The dosage form can be recommended for preclinical studies.

Keywords: ear drops, bacteriophages, otitis externa, *Pseudomonas aeruginosa*, rabbits, local irritation, systemic effect

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 O. Bakhrushina, Maria N. Anurova and Alexey M. Vorobiev and Yulia O. Shcherbina came up with and developed an experiment. Svatlana S. Bochkareva and Yulia O. Shcherbina conducted studies of local irritant and systemic effects on animals. Alexey M. Vorobiev, Maria A. Pasivkina and Lika O. Krekhtunova carried out microbiological studies *in vitro*. Maria A. Pasivkina and Lika O. Krekhtunova participated in data processing. Elena O. Bakhrushina carried out theoretical calculations. Elena O. Bakhrushina, Maria N. Anurova and Alexey M. Vorobiev participated in writing the text of the article. Natalia B. Demina and Andrey V. Aleshkin participated in the review and approval of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Bakhrushina E. O., Anurova M. N., Bochkareva S. S., Vorobev A. M., Shcherbina Yu. O., Pasivkina M. A., Krekhtunova L. O., Demina N. B., Aleshkin A. V. Development and study of bacteriophage-containing dosage form for the treatment of the outer ear infections. *Drug development & registration*. 2022;11(2):74–78. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-74-78>

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционные отиты наружного и среднего уха являются социально значимыми заболеваниями – ежегодно поражая около 31 миллиона человек по всему миру, они способны вызывать потерю слуха, что существенно снижает качество жизни пациентов [1–3].

Основными возбудителями острого бактериального отита являются *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Эти бактериальные агенты образуют биопленки с другими опатогенами и уси-

ливают врожденные воспалительные реакции, которые могут способствовать хроническому развитию среднего отита и прогрессированию гнойного воспаления [2]. В ряде случаев *Pseudomonas aeruginosa* вызывает также злокачественный наружный отит – тяжелое заболевание, при котором летальность составляет до 10 %. В странах с высоким уровнем дохода клинические рекомендации по лечению наружного и среднего отита включают антибиотикотерапию и применение пневмококковой конъюгированной вакцины [2].

Следует отметить, что инфекции, вызванные *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, зачастую плохо поддаются антибактериальной терапии в связи с множественной резистентностью, они устойчивы к действию многих аминогликозидов, цефалоспоринов и фторхинолонов, что снижает эффективность лечебных мероприятий у больных [3, 4].

Применение местных препаратов позволяет достичь более высокой концентрации антибактериального препарата в очаге инфекции, а в результате отсутствия длительного воздействия на бактериальный агент лекарственного вещества в субтерапевтической дозе сводится к минимуму возможность развития резистентности [3]. Местное лечение инфекционных отитов рекомендуется в случае наружного отита и среднего отита с достаточной величиной перфорации барабанной перепонки [2, 3].

Альтернативой препаратам антибиотиков местного действия, использующимся в оториноларингологической практике по всему миру, могут быть ушные капли с бактериофагами. Ушные капли являются удобной лекарственной формой для пациентов разных возрастов, обеспечивающей достижение максимальной концентрации в очаге воспаления в короткие сроки [5]. Фаготерапия успешно используется во многих странах мира в качестве инструмента преодоления антибиотикорезистентности и может применяться в рамках реализации персонализированного подхода к лечению пациента [6].

Целью работы является разработка лекарственной формы бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa* для местного лечения инфекционных отитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Действующими веществами разрабатываемого препарата являются бактериофаги, лизирующие бактериальные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*: PA5 и PA10, полученные методом выращивания на плотной питательной среде в матрасах с последующей стерилизующей фильтрацией через мембранный фильтр (0,22 мкм) и освобождением от эндотоксина на хроматографической колонке [7].

На основании изучения научной литературы для получения лекарственной формы были выбраны наиболее распространенные и хорошо изученные эксципиенты [7–9]. Анализ лекарственных препаратов в форме ушных капель по данным государственного реестра лекарственных средств на 2021 год показал, что наиболее часто в их состав входят следующие вспомогательные вещества: водно-спиртовые растворы различной концентрации и вода очищенная в качестве растворителей, глицерин в концентрации от 10 до 40 % и макроголы в качестве модификаторов вязкости, антиоксиданты – этилендиаминтетрауксусная кислота и ее соли, натрия тиосульфат, консерванты – хлорбутанола гидрат, бензалкония хлорид, тиомерсал, этанол, а также регуляторы pH.

В качестве растворителей и формообразующих веществ рассматривали возможность использования смесей воды очищенной и глицерина (ООО ТД «ХИММЕД», Россия) в соотношениях 1:2,5 и 1:1,25, макрогола 400 (ООО ТД «ХИММЕД», Россия) в соотношении 1:2,5 и смеси макрогола 6 и глицерил каприлокапрата марки Softigen® 767 (CREMER, Германия) в соотношении 1:2,5. В качестве антиоксиданта вводили этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), в качестве консервантов использовали парабены, как единственную группу стабилизаторов антимикробной устойчивости, разрешенную для применения в ушных лекарственных формах, обеспечивающую активность в диапазоне pH от 4 до 8 и не оказывающую литического действия на бактериофаги [7, 8]. В зависимости от возможностей производства готовую лекарственную форму можно разливать во флаконы с насадкой, обеспечивающей фильтрацию при эвакуации каждой последующей дозы, что позволит сделать препарат стерильным и исключить консерванты из фармацевтической композиции.

На первом этапе исследования изучали совместимость коктейля бактериофагов в выбранными вспомогательными веществами. Готовили стерильные водные растворы рабочих концентраций эксципиентов, в которые вводили коктейль бактериофагов и контролировали отсутствие падения титра бактериофагов по методу Грация сразу после введения спустя 24 часа и через 14 суток. Хранение экспериментальных образцов осуществляли в герметично запаенных стеклянных флаконах при температуре +5/+8. Затем получали экспериментальные образцы ушных капель, в которые бактериофаги вносили после термической стерилизации в течение 15 мин при температуре 121 °С. Литическая активность бактериофагов в одной капле (0,05 мл) составила 2×10^8 БОЕ PA5 и $2,2 \times 10^8$ БОЕ PA10.

Для всех экспериментальных составов изучали стабильность титра бактериофагов в течение 12 месяцев, определяемого по методу Грация, а также технологические характеристики лекарственной формы – значение pH потенциометрическим методом, на pH-метре pH-410 (АО «Аквион», Россия) при температуре 20–25 °С, плотность и вязкость на капиллярном вискозиметре Оствальда.

Оценку местнораздражающего и системного действия проводили на пяти кроликах самцах породы шиншилла массой 3,5–4,0 кг. Уход за животными и их содержание осуществляли в соответствии с рекомендациями и требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях и Хельсинской декларации. Все эксперименты на животных были одобрены этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского.

Для оценки местнораздражающего действия однократно проводили инстилляцию 3 капель экспериментального состава в одно ухо кролика, второе ухо

оставляли для контроля. Состояние кожи регистрировали визуально ежедневно в течение пяти дней. Отмечали функционально-морфологические нарушения кожи (эритема, отек, трещины, некроз, шелушение, сухость, изъязвления).

Для разрабатываемой лекарственной формы дизайном эксперимента предполагается оказание только местного действия. Для доказательства отсутствия системного действия производили забор крови кроликов из ушной вены через каждые 15 минут, считая от момента введения капель. Титр бактериофагов в крови определяли по методу Грациа. Титрование производили до 5-го разведения. Делали посев из «0», 1, 2, 3, 4 и 5-го разведений [7].

Для обработки результатов использовался пакет статистического анализа для Microsoft Office Excel 2016.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение стабильности титра бактериофагов в присутствии изучаемых вспомогательных веществ показало достоверное отсутствие падения титра, поэтому в дальнейшем эксперименте получали экспе-

риментальные образцы ушных капель на основе всех выбранных эксципиентов, составы приведены в таблице 1. Все образцы представляли собой прозрачные бесцветные или светло-коричневого цвета жидкости, удовлетворяющие требованиям государственной нормативной документации.

Для бактериофагов PA5 и PA10 значение pH, обеспечивающее стабильность титра, составляет 6–8 [5], этому требованию удовлетворяет только состав 2 с значением pH $6,63 \pm 0,02$. Показатели вязкости и плотности у составов 1, 3 и 4 близки, состав 2 обладает максимальными значениями плотности и вязкости. С потребительской точки зрения, ушные капли должны обладать достаточной вязкостью, обеспечивающей отсутствие вытекания из полости ушной раковины, поэтому состав 2 с показателем $3,9950 \pm 0,2$ мПа·с посчитали более перспективным для дальнейшего изучения.

Для этого состава определяли стабильность титра бактериофагов в процессе хранения. В результате проведенных исследований было установлено, что выбранный состав обеспечивает стабильность титра бактериофагов в течение 12 месяцев хранения (таблица 2).

Таблица 1. Составы экспериментальных образцов ушных капель и показатели качества

Table 1. The compositions of the experimental samples of ear drops and pharmacopeial quality indicators

№	Состав вспомогательных веществ, г Composition of excipients, g	Плотность, г/мл Density, g/ml	pH	Вязкость, мПа·с Viscosity, mPa·s
1	Глицерин 10,0 Нипагин/нипазол (1:3) 0,015 ЭДТА 0,025 Вода очищенная до 50,0 Glycerin 10,0 Nipagin/nipazol (1:3) 0,015 EDTA 0,025 Purified water up to 50,0	$1,0339 \pm 0,05$	$5,38 \pm 0,03$	$1,0339 \pm 0,05$
2	Глицерин 20,0 Нипагин/нипазол (1:3) 0,015 ЭДТА 0,025 Вода очищенная до 50,0 Glycerin 20,0 Nipagin/nipazol (1:3) 0,015 EDTA 0,025 Purified water up to 50,0	$1,1622 \pm 0,06$	$6,63 \pm 0,02$	$3,9950 \pm 0,2$
3	Макрогол-400 10,0 Нипагин/нипазол (1:3) 0,015 ЭДТА 0,025 Вода очищенная до 50,0 Macrogol-400 10,0 Nipagin/nipazol (1:3) 0,015 EDTA 0,025 Purified water up to 50,0	$1,0338 \pm 0,05$	$3,67 \pm 0,02$	$1,2923 \pm 0,06$
4	Softigen® 767 10,0 Нипагин/нипазол (1:3) 0,015 ЭДТА 0,025 Вода очищенная до 50,0 Softigen® 767 10,0 Nipagin/nipazol (1:3) 0,015 EDTA 0,025 Purified water up to 50,0	$1,0195 \pm 0,05$	$5,74 \pm 0,03$	$1,5675 \pm 0,08$

Таблица 2. Изучение стабильности титра бактериофагов в ушных каплях (БОЕ / 0,05 мл) при хранении 12 месяцев

Table 2. Stability study of the titer of bacteriophages in ear drops (PFU / 0,05 ml) when stored for 12 months

Экспозиция Exposition Штаммы Strains	24 часа 24 hours	3 месяца 3 months	6 месяцев 6 months	12 месяцев 12 months
PA5	$2,0 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$3,0 \times 10^7$
PA10	$2,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$

Следующим этапом исследования было определение местнораздражающего и системного действия.

После однократной инстилляцией трех капель испытуемого образца эритемы и отека тканей внутренней поверхности уха кроликов не наблюдалось, что соответствует отсутствию местнораздражающего действия. Для оценки системного действия проводили забор крови из ушной вены испытуемых животных с интервалом 15 минут в течение 1 часа после введения капель в ухо. Титр бактериофагов в крови определяли по методу Грациа. Для штаммов PA5 и PA10 было показано отсутствие роста негативных колоний.

Таким образом, было доказано отсутствие местнораздражающего и системного действия препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований разработан состав лекарственной формы с коктейлем бактериофагов PA5 и PA10 для применения в терапии инфекционных заболеваний среднего уха, вызванных *Pseudomonas aeruginosa*, обладающая доказанным местным действием и отсутствием местнораздражающего действия. Дальнейшее развитие темы заключается в разработке лекарственной формы, ее показателей, методик их определения и норм, а также в изучении вопросов стабильности в разработанной форме других бактериофагов для использования ее в качестве стандартной основы и применении в персонализированной фаготерапии больных с инфекционными отитами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nanno F. A., Peek W. Otological drops containing a novel antibacterial synthetic peptide: Safety and efficacy in adults with chronic suppurative otitis media. *PLoS One*. 2020;15(4):e0231573. DOI: 10.1371/journal.pone.0231573.
2. Schilder A. G. M., Chonmaitree T., Cripps A. W., Rosenfeld R. M., Casselbrant M. L., Haggard M. P., Venekamp R. P. Otitis media. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2(1):16063. DOI: 10.1038/nrdp.2016.63.
3. Brennan-Jones C. G., Chong L. Y., Head K., Tu N., Burton M. J., Schilder A. G. M., Bhutta M. F. Topical antibiotics with steroids for chronic suppurative otitis media. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;2018(6):CD013054. DOI: 10.1002/14651858.CD013054.
4. Чеботарь И. В., Боcharова Ю. А., Маянский Н. А. Механизмы резистентности *Pseudomonas aeruginosa* к Антибиотикам и их регуляция. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017;19(4):308–319.
5. Ranakusuma R. W., McCullough A. R., Safitri E. D., Pitoyo Y., Widyaningsih W., Del Mar C. B., Beller E. M. Oral prednisolone for acute otitis media in children: a pilot, pragmatic, randomised, open-label, controlled study (OPAL study) *Pilot Feasibility Stud*. 2020;6:121. DOI: 10.1186/s40814-020-00671-5.

bel, controlled study (OPAL study) *Pilot Feasibility Stud*. 2020;6:121. DOI: 10.1186/s40814-020-00671-5.

6. Бахрушина Е. О., Анурова М. Н., Алешкин А. В., Демина Н. Б., Краснюк И. И., Пятигорская Н. В., Береговых В. В. Некоторые аспекты применения и создания лекарственных препаратов бактериофагов. *Вестник РАМН*. 2021;76(4):351–360. DOI: 10.15690/vramn1380.
7. Алешкин А. В., Воложанцев Н. В., Веревкин В. В., Красильникова В. М., Мякина В. П., Попова А. В., Светоч Э. А. Композиция антибактериальная для профилактики или лечения госпитальных инфекций (варианты), штаммы бактериофагов, используемые для получения такой композиции. Патент РФ RU 2628312. 2015. Доступно по: https://rusneb.ru/catalog/000224_000128_0002628312_20170815_C2_RU/ Ссылка активна на 22.01.2022.
8. Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Демина Н. Б., Пантелеева Е. С. Обзор современных стабилизаторов микробиологической устойчивости. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(6):54–61. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-6-54-61.
9. Панюшин С. К., Кузнецова Г. В., Мантиков М. А. Антибактериальное средство. Патент РФ RU 2480239. 2013. Доступно по: https://rusneb.ru/catalog/000224_000128_0002480239_20130427_C2_RU/ Ссылка активна на 22.01.2022.

REFERENCES

1. Nanno F. A., Peek W. Otological drops containing a novel antibacterial synthetic peptide: Safety and efficacy in adults with chronic suppurative otitis media. *PLoS One*. 2020;15(4):e0231573. DOI: 10.1371/journal.pone.0231573.
2. Schilder A. G. M., Chonmaitree T., Cripps A. W., Rosenfeld R. M., Casselbrant M. L., Haggard M. P., Venekamp R. P. Otitis media. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2(1):16063. DOI: 10.1038/nrdp.2016.63.
3. Brennan-Jones C. G., Chong L. Y., Head K., Tu N., Burton M. J., Schilder A. G. M., Bhutta M. F. Topical antibiotics with steroids for chronic suppurative otitis media. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;2018(6):CD013054. DOI: 10.1002/14651858.CD013054.
4. Chebotar I. V., Bocharova Yu. A., Mayansky N. A. Mechanisms and regulation of Antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;19(4):308–319. (In Russ.)
5. Ranakusuma R. W., McCullough A. R., Safitri E. D., Pitoyo Y., Widyaningsih W., Del Mar C. B., Beller E. M. Oral prednisolone for acute otitis media in children: a pilot, pragmatic, randomised, open-label, controlled study (OPAL study) *Pilot Feasibility Stud*. 2020;6:121. DOI: 10.1186/s40814-020-00671-5.
6. Bakhrushina E. O., Anurova M. N., Aleshkin A. V., Demina N. B., Krasnyuk I. I., Pyatigorskaya N. V., Beregovykh V. V. Modern tendencies of the use and development of drugs of bacteriophages. *Vestnik RAMN*. 2021;76(4):351–360. DOI: 10.15690/vramn1380. (In Russ.)
7. Aleshkin A. V., Volozhantsev N. V., Verevkin V. V., Krasnikova V. M., Myakina V. P., Popova A. V., Svetoch E. A. Antibacterial composition for the prevention or treatment of hospital infections (versions), bacteriophage strains used to obtain such a composition. Patent RUS RU 2628312. 2015. Available at: https://rusneb.ru/catalog/000224_000128_0002628312_20170815_C2_RU/ Accessed: 22.01.2022. (In Russ.)
8. Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Demina N. B., Panteleeva E. S. Modern preservatives of microbiological stability. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;6(53):79–86. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-6-54-61.
9. Paniushin S. K., Kuznetsova G. V., Mantikov M. A. Antibacterial agent. Patent RUS RU 2480239. 2013. Available at: https://rusneb.ru/catalog/000224_000128_0002480239_20130427_C2_RU/ Accessed: 22.01.2022. (In Russ.)

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-79-86>
УДК 615.456.4



Оригинальная статья / Research article

Проточное диспергирование для получения микрочастиц поликапролактона с инкапсулированным ивермектином

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

¹ ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (РТУ МИРЭА), 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86

² АО «Институт фармацевтических технологий» (АО «ИФТ»), 121353, Россия, г. Москва, Сколковское шоссе, д. 21, офис 1

✉ Контактное лицо: Суслов Василий Викторович. E-mail: suslov@ipt.ru.com

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

Статья поступила: 05.07.2021

Статья принята в печать: 15.03.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Ивермектин – противопаразитарный препарат, который широко зарекомендовал себя в ветеринарии. Паразитарные болезни сельскохозяйственных животных причиняют большой экономический ущерб и несут опасность заражения человека. Для эффективной борьбы с ними практический интерес представляют пролонгированные лекарственные формы ивермектина. Первым шагом в создании такого препарата стало получение и изучение полимерных микрочастиц поликапролактона с инкапсулированным ивермектином.

Цель. Получение полимерных микрочастиц поликапролактона с инкапсулированным ивермектином с использованием проточной установки непрерывного действия.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись микрочастицы поликапролактона с инкапсулированным ивермектином, полученные на проточной установке непрерывного действия. Определение среднего размера частиц и их распределение по размеру проводили методом лазерной дифракции. С помощью микроскопии проводили визуальную оценку формы и размеров микрочастиц. Количественное определение ивермектина определяли с помощью УФ-спектрофотометрии.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования позволили получить полимерные микрочастицы поликапролактона с инкапсулированным ивермектином, которые имели средний размер $126,63 \pm 42,67$ мкм и содержали 32,73–62,00 % ивермектина. Суспензии, приготовленные из полученных микрочастиц, без заметного сопротивления проходили через инъекционную иглу 20G, что свидетельствует о возможности их использования в качестве основы инъекционного препарата.

Заключение. В рамках проведенного исследования были получены результаты, которые подтверждают возможность применения проточного диспергирования с использованием разработанной нами установки для получения микрочастиц поликапролактона с инкапсулированным ивермектином, которые пригодны для инъекционного введения. Таким образом, полученные результаты позволяют продолжить исследования микрочастиц и создание препарата на их основе.

Ключевые слова: ивермектин, поликапролактон, микрочастицы, микрофлюидное устройство, пролонгированный препарат, инъекционный препарат

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

Вклад авторов. В. В. Суслов и О. И. Рыбченко составили план эксперимента. О. И. Рыбченко провела эксперимент. С. А. Кедик, Ю. М. Домнина, А. И. Могайбо принимали участие в обсуждении и анализе полученных результатов. Все авторы участвовали в обсуждении и интерпретации полученных результатов, а также написании текста статьи.

Благодарность. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП РТУ МИРЭА при поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Рыбченко О. И., Суслов В. В., Кедик С. А., Домнина Ю. М., Могайбо А. И. Проточное диспергирование для получения микрочастиц поликапролактона с инкапсулированным ивермектином. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):79–86. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-79-86>

Flow Dispersion for Obtaining Ivermectin Encapsulated in Polycaprolactone Microparticles

Oxana I. Rybchenko¹, Vasily V. Suslov¹✉, Stanislav A. Kedik¹, Yulia M. Domnina¹, Anastasiya I. Mogaibo^{1,2}

¹ Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "MIREA – Russian Technological University", 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

² JSC Institute of Pharmaceutical Technologies, 21/1, Skolkovskoye highway, Moscow, 121353, Russia

✉ Corresponding author: Vasily V. Suslov. E-mail: suslov@ipt.ru.com

ORCID: Oxana I. Rybchenko – <https://orcid.org/0000-0002-1326-3577>; Vasily V. Suslov – <https://orcid.org/0000-0002-9578-2492>; Stanislav A. Kedik – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>; Yulia M. Domnina – <https://orcid.org/0000-0002-2745-9431>; Anastasiya I. Mogaibo – <https://orcid.org/0000-0003-3759-2866>.

Received: 05.07.2021

Revised: 15.03.2022

Published: 25.05.2022

© Рыбченко О. И., Суслов В. В., Кедик С. А., Домнина Ю. М., Могайбо А. И., 2022

© Rybchenko O. I., Suslov V. V., Kedik S. A., Domnina Yu. M., Mogaibo A. I., 2022

Abstract

Introduction. Ivermectin is an antiparasitic drug that has been widely used in veterinary medicine. Parasitic diseases of farm animals cause great economic damage and pose the risk of human infection. Prolonged dosage forms of ivermectin are effective against them. The first step in the creation of such a drug was the preparation and study of polymeric microparticles of polycaprolactone with encapsulated ivermectin.

Aim. Obtaining polymeric microparticles of polycaprolactone with encapsulated ivermectin using a continuous flow-through unit.

Materials and methods. The object of the study was microparticles of polycaprolactone with encapsulated ivermectin obtained on a continuous flow-through unit. Determination of the average particle size and size distribution was carried out by the method of laser diffraction. Microscopy was used to visually assess the shape and size of the microparticles. UV – spectrophotometry was used to quantitative determination of ivermectin.

Results and discussion. Polymeric microparticles of polycaprolactone with encapsulated ivermectin was obtained and had an average size of $126.63 \pm 42.67 \mu\text{m}$ and contained 32,73–62,00 % of ivermectin. Suspensions prepared from the obtained microparticles were passed through a 20G injection needle without noticeable resistance, which indicates the possibility of their use as the basis of an injectable preparation.

Conclusion. Obtained results confirm the possibility of using flow-through dispersion using a device developed by us for obtaining polycaprolactone microparticles with encapsulated ivermectin, which are suitable for injection. Thus, the results obtained make it possible to continue studies of microparticles and create a drug based on them.

Keywords: ivermectin, polycaprolactone, microparticles, microfluidic device, prolonged-release drug, injectable 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. Vasily V. Suslov and Oxana I. Rybchenko drew up an experiment plan. Oxana I. Rybchenko conducted an experiment. Stanislav A. Kedik, Yulia M. Domnina, Anastasiya I. Mogaibo took part in the discussion and analysis of the results. All authors took part in writing and reviewing the text of the article.

Acknowledgment. This work was performed using the equipment of the Shared Science and Training Center for Collective Use RTU MIREA and supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

For citation: Rybchenko O. I., Suslov V. V., Kedik S. A., Domnina Yu. M., Mogaibo A. I. Flow dispersion for obtaining ivermectin encapsulated in polycaprolactone microparticles. *Drug development & registration*. 2022;11(2):79–86. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-79-86>

ВВЕДЕНИЕ

Ивермектин (22,23-дигидроавермектин) полусинтетический препарат, получаемый из продуктов жизнедеятельности бактерии *Streptomyces avermitilis* и представляющий собой смесь макролидов. Он широко используется в ветеринарии для профилактики и лечения различных эндо- и эктопаразитарных заболеваний [1, 2]. В ряде стран ивермектин нашел применение для лечения онхоцеркоза, лимфатического филяриоза, стронгилоидоза и чесотки у людей. Также он был предложен в качестве дополнительного средства для борьбы с переносчиками (комарами *Anopheles*) в терапии малярии [3–5]. Недавно были получены данные, свидетельствующие о том, что ивермектин ингибирует репликацию SARS-CoV-2 *in vitro*, что делает его возможным агентом для терапии коронавирусной инфекции [6].

Известно, что паразитарные болезни сельскохозяйственных животных причиняют большой экономический ущерб, складывающийся из значительно снижения прироста массы тела, настига шерсти и нередко падежа животных, особенно молодняка [7–9]. Для эффективной борьбы с ними практический интерес представляют пролонгированные лекарственные препараты, применение которых позволяет поддерживать в организме животных эффективную терапевтическую концентрацию антипаразитарных агентов в течение длительного времени [10–13]. В настоящее время в медицинскую и ветеринарную практику введены три формы пролонгированных препаратов [14]:

- твердые имплантаты, получаемые экструзионными методами и вводимые хирургически или с использованием специальных шприцов-аппликато-

ров, например препарат Золадекс® (AstraZeneca UK Limited, Великобритания);

- инъекционные растворы на основе биоразлагаемых материалов, формирующие имплантаты или гели в месте введения (*in situ*), например ветеринарный препарат LongRange® (Merial S.A.S., Франция);
- инъекционные суспензии полимерных биоразлагаемых микрочастиц, содержащих лекарственное средство, например препарат Вивитрол® (Alkermes, Inc., США).

Наибольшее распространение получили пролонгированные инъекционные препараты на основе полимерных микрочастиц в связи с их стабильностью, терапевтической эффективностью, удобством их дозирования и введения [15]. Максимальное значение размера микрочастиц, пригодных для инъекционного введения, составляет около 200 мкм [16]. Такой размер обеспечит им свободное прохождение через инъекционные иглы 20G и 18G с внутренним диаметром 0,603 и 0,838 мм соответственно.

В основе большинства способов получения частиц лежит процесс эмульгирования растворов полимера с активным веществом с последующим отверждением полученных капель эмульсии за счет испарения/экстракции органических растворителей [17, 18]. Перспективным подходом для получения эмульсий является использование капельной микрофлюидики, позволяющей получать эмульсии и микрочастицы в проточном режиме [19–22].

В статье описан разработанный нами в ходе создания инъекционного пролонгированного противопаразитарного препарата способ получения по-

лимерных микрочастиц из поликапролактона – наиболее дешевым и доступным биоразлагаемым полимером с инкапсулированным ивермектином – высокоэффективным противопаразитарным средством.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Объектом исследования являлись микрочастицы из поликапролактона, содержащие инкапсулированный ивермектин.

В работе использовали: ивермектин (Huashu Pharmaceutical Corporation, Китай); поликапролактон $M_n = 80\,000$ Да (кат. № 440744, Sigma-Aldrich, США); поливиниловый спирт (ПВС) (Chang Chun Petrochemical Co. Ltd., Тайвань); хлористый метилен (х.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Россия); воду очищенную (ФС.2.2.0020.15); кармеллозу натрия (Blanose CMF 7LF-PH, Франция); 0,1%-й полисорбат 20 (Fluca, Швейцария) и натрия хлорид (х.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Россия).

Приготовление раствора поливинилового спирта

Навеску массой 100 г, отмеренную с помощью аналитических весов HT-224CE (VIBRA, Япония), поливинилового спирта помещали в 4900 мл воды очищенной, перемешивали при температуре 50–60 °C до полного растворения. Полученный раствор профильтровывали через стеклянный пористый фильтр с диаметром пор 100 мкм.

Получение полимерных микрочастиц с ивермектином

Получение микрочастиц осуществляли с использованием разработанной нами установки непрерывного действия (рисунок 1) по следующей методике: в циркулирующий с постоянной скоростью через установку 2%-й водный раствор поливинилового спирта (дисперсионная среда) через иглу размером 22G (рисунок 2, 1) в узле диспергирования подавали с постоянным расходом раствор смеси поликапролактона и ивермектина в хлористом метиле (дисперсная фаза). Циркуляцию дисперсионной среды с постоянным расходом осуществляли посредством шестеренчатого насоса (рисунок 1, 4), а постоянным расход дисперсной фазы обеспечивался посредством подачи в емкость с органической фазой (рисунок 1, 8) воздуха с постоянным давлением. Образовавшиеся микрокапли дисперсной фазы концентрировали в проточном сепараторе (рисунок 1, 2) и собирали в приемник дисперсии (рисунок 1, 3).

Собранную дисперсию смешивали с 0,5%-м раствором поливинилового спирта в соотношении 1:4 и выдерживали в течение 15 часов при перемешивании лопастной верхнеприводной мешалкой RW 16 basic (IKA®, Германия) (200–240 об/мин) при температуре 18–20 °C для удаления хлористого метилена и формирования суспензии микрочастиц. Затем суспензию отстаивали и удаляли надосадочную жидкость. Сконцентрированную суспензию смешивали с водой очищенной в соотношении 1:100 и перемешивали в течение часа при той же температуре. Микро-

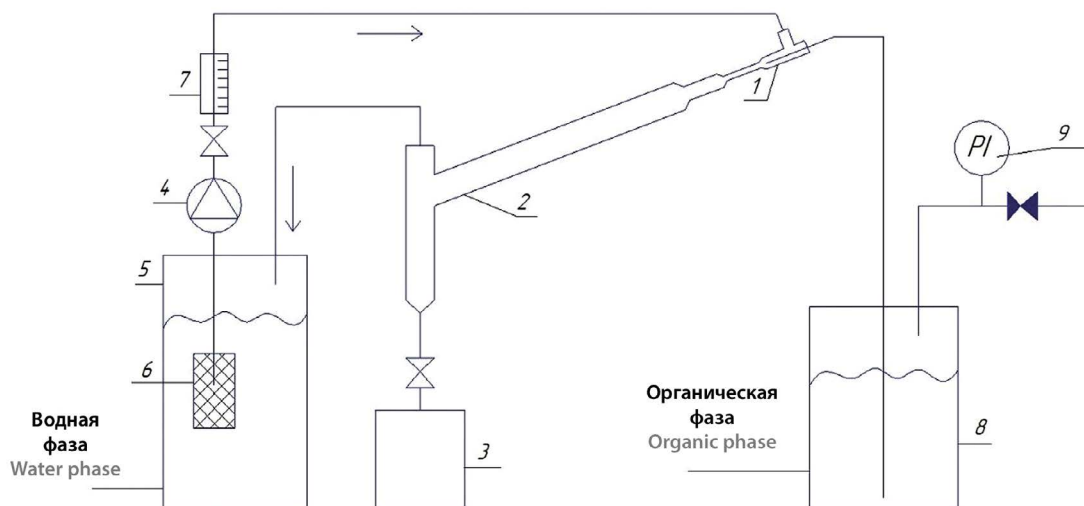


Рисунок 1. Схема установки:

1 – узел диспергирования; 2 – проточный сепаратор дисперсии; 3 – приемник дисперсии; 4 – циркуляционный шестеренчатый насос Lab 2015 (Shenzhen, Китай); 5 – емкость для раствора поливинилового спирта (дисперсионная среда); 6 – фильтр сетчатый; 7 – ротаметр с игольчатым вентилем; 8 – емкость для исходного раствора ивермектина (дисперсная фаза); 9 – регулятор давления с манометром

Figure 1. Installation scheme:

1 – dispersion unit; 2 – flow-through dispersion separator; 3 – dispersion receiver; 4 – circulating gear pump Lab 2015 (Shenzhen, China); 5 – tank for polyvinyl alcohol solution (dispersion medium); 6 – mesh filter; 7 – rotameter with a needle valve; 8 – container for the initial solution of ivermectin (dispersed phase); 9 – pressure regulator with a manometer

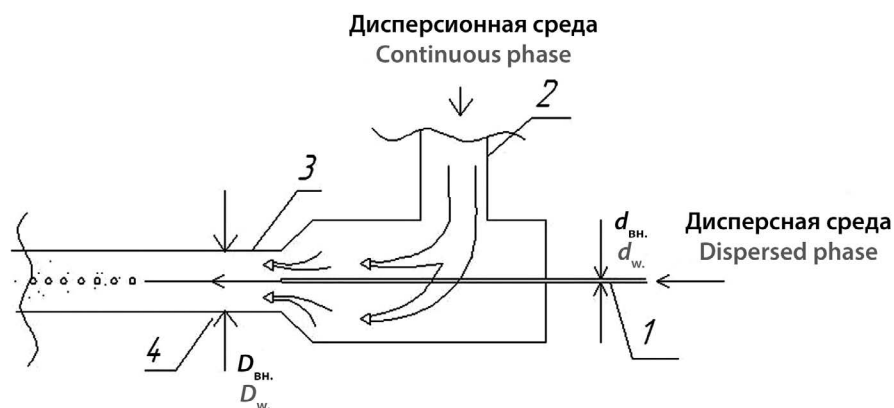


Рисунок 2. Узел диспергирования:

1 – игла для ввода органической фазы; $d_{\text{вн.}} = 0,4 \text{ мм}$ (22G); 2 – ввод водной фазы; 3 – стеклянная трубка; $D_{\text{вн.}} = 3 \text{ мм}$; 4 – вывод образовавшейся дисперсии

Figure 2. Dispersion unit:

1 – needle for injecting the organic phase; $d_{\text{вн.}} = 0.4 \text{ mm}$ (22G); 2 – inlet of the aqueous phase; 3 – glass tube; $D_{\text{вн.}} = 3 \text{ mm}$; 4 – withdrawal of the resulting dispersion

частицы отфильтровывали на стеклянном пористом фильтре с диаметром пор 100 мкм и высушивали на воздухе.

Распределение частиц по размерам

Определение среднего размера частиц и их распределение по размеру проводили методом лазерной дифракции с помощью анализатора размера частиц LS 13 320 (Beckman Coulter, США).

Микроскопия

Микроскопию проводили для визуальной оценки формы и размера микрочастиц. Суспензию микрочастиц наносили на чистое предметное стекло и покровным стеклом распределяли каплю по поверхности предметного стекла. Затем покровное стекло опускали на смоченную поверхность предметного стекла, избыток жидкости удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Изображение микрочастиц получали с помощью микроскопа Olympus CX31 (Olympus Corporation, Япония) снабженного цифровой камерой TourCam U3CMOS03100KPA (TourTek, Китай).

Количественное содержание ивермектина

Содержание ивермектина в микрочастицах определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Cary 60 (Agilent Technologies, США) при длине волны 244 нм. Для данной методики была проведена валидация по параметрам специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и промежуточная прецизионность). Методика соответствовала по всем параметрам критериям приемлемости.

Приготовление испытуемых растворов

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали около 0,01–0,02 мг (точная навеска) стандартного образца ивермектина с помощью аналитических весов HT-224CE (VIBRA, Япония), растворяли в хлороформе и доводили объем раствора хлороформом до метки.

Проводили разбавление в 25 раз. Для этого отбирали 1 мл градуированной пипеткой, помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора до метки хлороформом.

Проходимость через иглу

В пенициллиновый флакон помещали 4 мл водного раствора, содержащего 2,5 % кармеллозы натрия, 0,1 % полисорбата и 0,9 % натрия хлорида, добавляли 1 г порошка микрочастиц. Тщательно перемешивали, интенсивно встряхивая флакон в течение 1 минуты. Полученную суспензию из флакона набирали в шприц через иглу для инъекции 20G, затем выдавливали суспензию обратно во флакон. Оценивали полноту извлечения суспензии из флакона и выдавливания ее из шприца, а также необходимое усилие для заполнения и опустошения шприца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее микрочастицы поликапролактона, содержащие ивермектин, были получены методом простого эмульгирования с последующей экстракцией испарением. Для этого раствор ивермектина и поликапролактона в хлористом метиле [дисперсная фаза (ДФ)] диспергировали с помощью магнитной мешалки при 300 об/мин в растворе поливинилового спирта (дисперсионная фаза). После чего удаляли

хлористый метилен из полученной дисперсии (эмульсия типа «масло в воде») в результате его экстракции или испарения [23, 24]. Полученные микрочастицы имели достаточно широкое распределение по размерам и мало пригодны для инъекционного введения вследствие возможного закупоривания иглы крупными частицами.

Нами для получения микрочастиц в узле диспергирования дисперсные фазы с различным соотношением ивермектин/полимер (таблица 1) (рисунок 4) с постоянными расходами вводились в поток дисперсионной среды (ДС), циркулирующий с постоянным расходом ($F_{дс}$) – 75 г/мин. Подачу дисперсной фазы проводили при трех значениях давления воздуха 0,3–0,35–0,4 бар, что обеспечивало ее постоянный расход в ходе эксперимента. Соответствующий каждому значению давления, фактический массовый расход дисперсной фазы, определяли по изменению массы емкости с дисперсной фазой.

Таблица 1. Состав дисперсной фазы

Table 1. Composition of the dispersed phase

Дисперсная фаза Dispersed phase	Ивермектин, г Ivermectin, g	Поликапролактон, г Polycaprolactone, g	Хлористый метилен, мл Methylene chloride, ml	ИВ:ПКЛ IV:PCL
ДФ1 DF1	5,0	2,5	63,5	2:1
ДФ2 DF2	1,50	2,25	61,0	1:1,5
ДФ3 DF3	2,25	1,50	61,0	1,5:1
ДФ4 DF4	3,00	3,00	65,3	1:1

Следует отметить, что формирование капель при выбранных расходах происходило в так называемом струйном режиме сужающейся струи (рисунок 3, А), сопровождающейся формированием струи дисперсной фазы с последующим ее распадом на

капли вследствие капиллярной неустойчивости Рэлея – Плато. Такой режим достигается при высоких значениях расходов дисперсной фазы и дисперсионной среды, что может быть полезным для обеспечения высокой производительности оборудования при получении микрочастиц. Получаемые в данном режиме микрочастицы имеют более широкое распределение по размерам в сравнении с микрокаплями и микрочастицами, получаемыми при низких расходах в так называемом капельном режиме [25] (рисунок 3, Б).

После удаления хлористого метилена из полученных дисперсий микрокапель получали суспензии микрочастиц (рисунок 4, А, Б) и анализировали их распределение по размерам (рисунок 4, В). Затем микрочастицы отделяли и после высушивания спектрофотометрически определяли содержание в них ивермектина.

В таблице 2 представлены результаты анализа размеров микрочастиц, полученных при различных расходах дисперсной фазы ($F_{дф}$), и результаты определения количественного содержания ивермектина в полученных микрочастицах ω , %.

Средний диаметр полученных микрочастиц имел обратную зависимость от отношения расходов дисперсной фазы ($F_{дф}$) и дисперсионной среды ($F_{дс}$) и уменьшался с ростом этого соотношения (рисунок 5). Данная зависимость согласуется с результатами, полученными ранее на примерах получения дисперсий и эмульсий различного состава. Например, аналогичная зависимость была установлена при получении микрочастиц на основе сополимеров метакриловой кислоты [26].

Для инъекционного введения пролонгированных лекарственных препаратов на основе полимерных микрочастиц обычно используют иглы калибра 20G (Вивтрол®, ООО Джонсон & Джонсон, Россия) и 18G («Бусерелин-депо», ЗАО «Фарм-Синтез», Россия). Применение игл большего калибра нежелательно вследствие травмирования тканей человека и животных. Все полученные микрочастицы без заметного сопротивления проходили через инъекционные иглы 20G, что делает возможным их использование в качестве основы инъекционного пролонгированного препарата ивермектина.

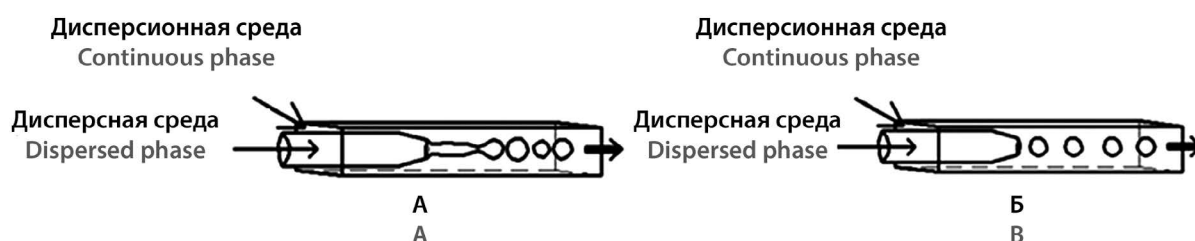


Рисунок 3. Режимы формирования капель:

А – струйный; Б – капельный

Figure 3. Droplet formation modes:

А – jetting; Б – dripping

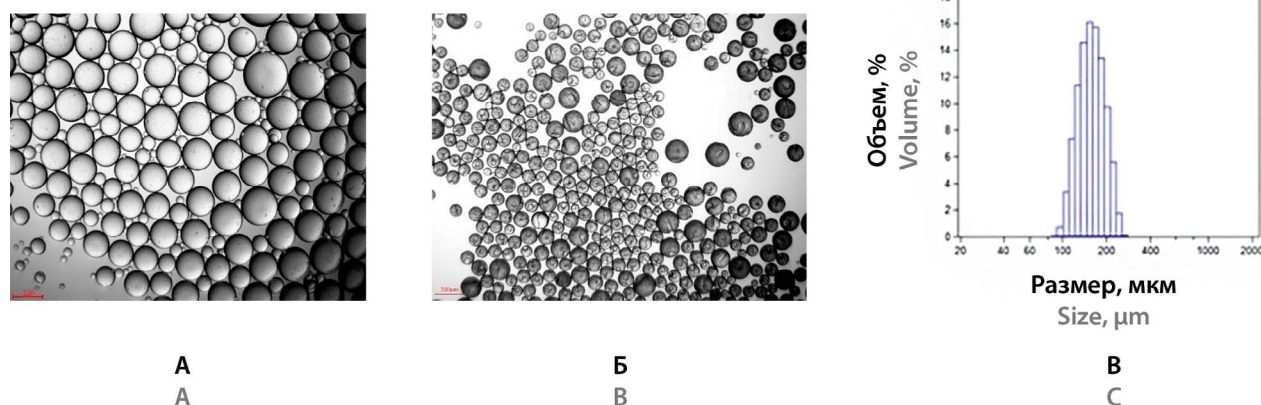


Рисунок 4. Суспензии микрочастиц и анализирование их распределение по размерам

А – микрофотография капель дисперсии, образец 1.2 (увеличение 4х); **Б** – микрофотография микрочастиц, образец 1.2 (увеличение 4х); **В** – распределение частиц по размерам, образец 1.2

Figure 4. Suspensions of microparticles and analysis of their size distribution

A – micrograph of dispersion droplets, sample 1.2 (4x magnification); **B** – micrograph of microparticles, sample 1.2 (4x magnification); **C** – particle size distribution, sample 1.2

Таблица 2. Экспериментальные условия и характеристики полученных микрочастиц

Table 2. Experimental conditions and preparation of the obtained microparticles by size

№ п/п Sample No.	Дисперсная фаза Dispersed phase	$P_{\text{возд.}}^{\text{в}} / \text{бар}$ $P_{\text{air.}}^{\text{v}} / \text{bar}$	$F_{\text{дс}}^{\text{с}} / \text{г/мин}$ $F_{\text{dm}}^{\text{s}} / \text{g/min}$	$F_{\text{дф}}^{\text{ф}} / F_{\text{дс}}^{\text{с}}$ $F_{\text{dp}}^{\text{f}} / F_{\text{dm}}^{\text{s}}$	Размер микрочастиц, мкм Microparticle size, μm			$\omega, \%$
					$D_{\text{ср.}}^{\text{ср.}}$ $D_{\text{m.}}$	D_{10}	D_{90}	
1.1	ДФ1 DF1	0,40	1,80	41,67	169,30	124,80	227,20	46.25
1.2		0,35	1,46	51,37	157,90	119,60	208,40	61.79
1.3		0,30	1,03	72,82	108,70	88,89	154,60	42.49
2.1	ДФ2 DF2	0,40	2,30	32,61	139,10	103,00	185,10	38.96
2.2		0,35	1,49	50,34	122,00	95,71	163,20	35.13
2.3		0,30	1,10	68,18	85,59	71,62	158,00	32.73
3.1	ДФ3 DF3	0,40	1,95	38,46	152,20	109,60	195,80	49.26
3.2		0,35	1,56	48,08	133,10	97,68	186,90	55.00
3.3		0,30	1,15	65,22	119,20	87,63	174,00	62.00
4.1	ДФ4 DF4	0,40	1,17	64,10	109,00	86,01	191,30	49.04
4.2		0,35	0,86	87,21	98,20	79,98	213,40	47.04
4.3		0,30	0,81	92,59	83,96	70,70	177,30	46.15

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты подтвердили возможность применения разработанной нами установки для получения микрочастиц поликапролактона, содержащих инкапсулированный ивермектин. Была показана зависимость среднего размера полученных микрочастиц от соотношения расходов дисперсной фазы и дисперсионной среды. Исследованные режимы диспергирования позволили получить микрочастицы пригодные для инъекционного введения, имеющие средний размер от 83,96 до 169,30 мкм и содержащие от 32,73 до 62,00 % ивермектина. Полученные микрочастицы представляют интерес для

дальнейшего изучения и могут быть использованы в качестве основы при разработке пролонгированного препарата ивермектина.

ЛИТЕРАТУРА

- McCall J.W. The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventives: a review, an update, and recommendations. *Vet. Parasitol.* 2005;133(2–3):197–206. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.04.005.
- Genchi C., Rinaldi L., Mortarino M., Genchi M., Cringoli G. Climate and Dirofilaria infection in Europe. *Vet. Parasitol.* 2009;163:286–292. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.03.026.
- Koblinsky K. C., Deus K. M., Butters M. P., Hongyu T., Gray M., DaSilva I. M., Sylla M., Foy B. D. The effect of oral antelmintics on the survivorship and re-feeding frequency of anthropophilic mosquito disease vectors. *Acta Trop.* 2010;116:119–126. DOI: 10.1016/j.actatropica.2010.06.001.

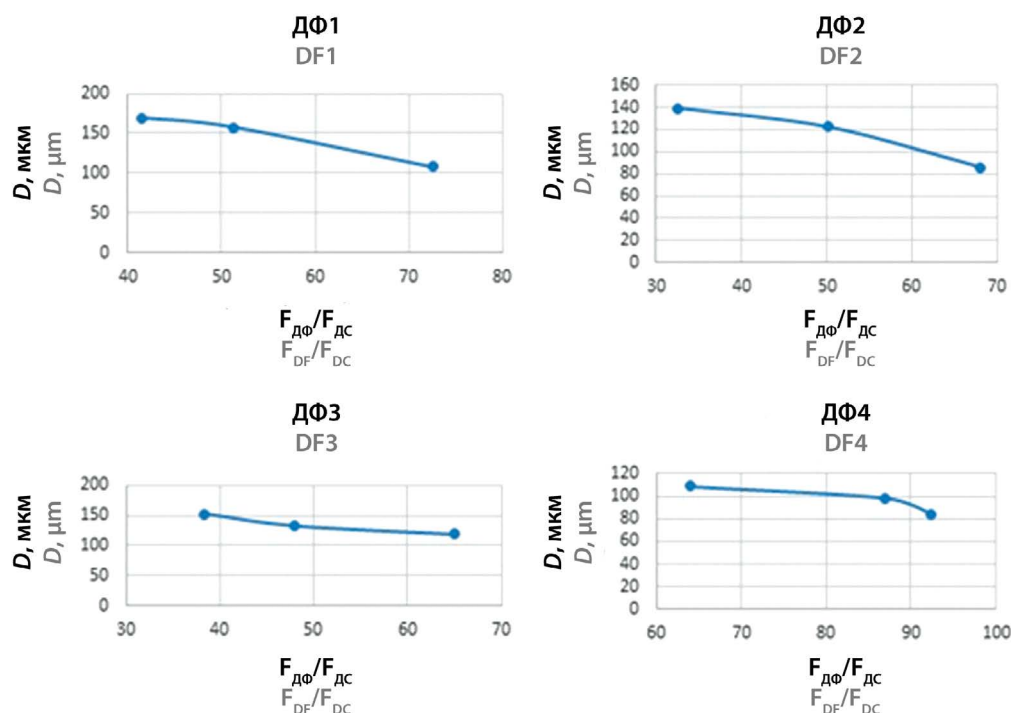


Рисунок 5. Зависимости размера капель от соотношения расходов водной и органической фаз

Figure 5. Dependences of the droplet size on the ratio of the flow rates of the aqueous and organic phases

- Koblinsky K. C., Sylla M., Chapman P. L., Sarr M. D., Foy B. D. Ivermectin mass drug administration to human disrupt malaria parasite transmission in Senegales villages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011;85(1):3–5. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.11-0160.
- 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(2). 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.
- Rashid M., Rashid M. I., Akbar H., Ahmad L., Hassan M. A., Ashraf K., Saeed K., Gharbi M. A systematic review on modelling approaches for economic losses studies caused by parasites and their associated diseases in cattle, *Parasitology.* 2019;146(2):129–141. DOI: 10.1017/S0031182018001282.
- Ali M. S., Saeed K., Rashid I., Ijaz M., Akbar H., Rashid M., Ashraf K. Anthelmintic Drugs: Their Efficacy and Cost-Effectiveness in Different Parity Cattle. *Parasitol.* 2018;104(1):79–85 DOI: 10.1645/17-4.
- Белименко В. В., Самойловская Н. А., Новосад Е. В., Гулюкин А. М., Махмадшова З. А., Христиановский П. И. Особенности экономического ущерба от эхинококкоза у сельскохозяйственных животных. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные.* 2017;7:15–19.
- Ferreira da Silva C., Taline A., de Melo Barbosa R., Cardoso J. C., Morsink M., Barbosa Souto E., Severino P. New Trends in Drug Delivery Systems for Veterinary Applications. *Pharmaceutical Nanotechnology.* 2021;9(1):15–25. DOI: 10.2174/2211738508666200613214548.
- Sasidharan S., Saudagar P. Encapsulation and delivery of antiparasitic drugs: a review. *Medicine.* 2020;323–342. DOI: 10.1016/B978-0-12-819363-1.00017-X.
- Суслов В. В., Енгашева Е. С., Кедик С. А., Шняк Е. А., Максимова П. О. Пролонгированные формы антигельминтных препаратов. *Российский паразитологический журнал.* 2016.38(4):539–546. DOI: 10.12737/23080.
- Baiak B. H. B., Lehnen C. R., da Rocha R. A. Anthelmintic resistance in cattle: A systematic review and meta-analysis. *Livestock Science.* 2018;217:127–135. DOI: 10.1016/j.livsci.2018.09.022.
- Chaudhary K., Patel M. M., Mehta P. J. Long-Acting Injectables: Current Perspectives and Future Promise *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems.* 2019;36(2):137–181. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2018025649.
- Жаворонок Е. С., Кедик С. А., Панов А. В., Петрова Е. А., Суслов В. В., ред. Полимерные микрошарики для медицины и биологии. М.: ЗАО «ИФТ»; 2014. 480 с.
- Beck L. R., Pope V. Z., Tice T. R., Gilley R. M. Long-acting injectable microsphere formulation for the parenteral administration of levonorgestrel. *Advances in Contraception.* 1985;1:119–129. DOI: 10.1007/BF01849793.
- Нгуен Т. Т. Т., Кедик С. А., Суслов В. В., Шняк Е. А., Ворфоломеева Е. В., Никонова Е. В. Разработка метода получения полимерных микросфер, содержащих иммобилизованный диклофенак. *Тонкие химические технологии.* 2015;10(4):27–31.
- Кедик С. А., Омелченко О. А., Суслов В. В., Шняк Е. А. Разработка способа получения налтрексона основания, инкапсулированного в полимерные микрошарики. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2018;1(1):32–35.
- Li W., Zhang L., Ge X., Xu B., Zhang W., Qu L., Choi C.-H., Xu J., Zhang A., Lee H., Weitz D. A. Microfluidic fabrication of microparticles for biomedical applications. *The Royal Society of Chemistry Reviews.* 2018;47(15):5646–5683. DOI: 10.1039/c7cs00263g.
- Wang J., Li Y., Wang X., Wang J., Tian H., Zhao P., Tian Y., Gu Y., Wang L., Wang C. Droplet Microfluidics for the Production of Microparticles and Nanoparticles. *Micromachines.* 2017;8(22):1–23. DOI: 10.3390/mi8010022.
- Aceves-Serrano L. G., Ordaz-Martinez K. A., Vazquez-Piñon M., Hwang H. Microfluidics for drug delivery systems. *Nanoarchitectonics in Biomedicine.* 2019;55–83. DOI: 10.1016/B978-0-12-816200-2.00002-5.
- Martino C., deMello A. J. Droplet-based microfluidics for artificial cell eneration: a brief review. *Interface Focus.* 2016;6(4):20160011. DOI: 10.1098/rsfs.2016.0011.

23. 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;46:101–110. DOI: 10.1016/j.jddst.2018.04.014.
24. 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.
25. Lan W., Li S., Luo G. Numerical and experimental investigation of dripping and jetting flow in a coaxial micro-channel. *Chem. Eng. Sci.* 2015;134:76–85. DOI: 10.1016/j.ces.2015.05.004.
26. Vasiliu S., Lungan M. A., Racovita S., Popa M. Porous microparticles based on methacrylic copolymers and gellan as drug delivery systems. *Polymer International*. 2020;69:11:1066–1080. DOI: 10.1002/pi.5917.
15. Zhavoronok E. S., Kedik S. A., Panov A. V., Petrova E. A., Suslov V. V. Polymer microparticles for medicine and biology. Moscow: ZAO "IFT"; 2014. 480 p. (In Russ.)
16. Beck L. R., Pope V. Z., Tice T. R., Gilley R. M. Long-acting injectable microsphere formulation for the parenteral administration of levonorgestrel. *Advances in Contraception*. 1985;1:119–129. DOI: 10.1007/BF01849793.
17. Nguen T. T. T., Kedik S. A., Suslov V. V., Shnyak E. A., Vorfolomeeva E. V., Nikonorova E. V. Development of a method for preparing polymer microspheres containing immobilized diclofenac. *Fine Chemical Technologies*. 2015;10(4):27–31. (In Russ.)
18. Kedik S. A., Omelchenko O. A., Suslov V. V., Shnyak E. A. Development of a method for the preparation of the naltrexone base encapsulated in polymeric microparticles. *Drug development & registration*. 2018;1:32–35. (In Russ.)
19. Li W., Zhang L., Ge X., Xu B., Zhang W., Qu L., Choi C.-H., Xu J., Zhang A., Lee H., Weitz D. A. Microfluidic fabrication of microparticles for biomedical applications. *The Royal Society of Chemistry Reviews*. 2018;47(15):5646–5683. DOI: 10.1039/c7cs00263g.
20. Wang J., Li Y., Wang X., Wang J., Tian H., Zhao P., Tian Y., Gu Y., Wang L., Wang C. Droplet Microfluidics for the Production of Microparticles and Nanoparticles. *Micromachines*. 2017;8(22):1–23. DOI: 10.3390/mi8010022.
21. Aceves-Serrano L. G., Ordaz-Martinez K. A., Vazquez-Piñon M., Hwang H. Microfluidics for drug delivery systems. *Nanoarchitectonics in Biomedicine*. 2019;55–83. DOI: 10.1016/B978-0-12-816200-2.00002-5.
22. Martino C., deMello A. J. Droplet-based microfluidics for artificial cell eneration: a brief review. *Interface Focus*. 2016;6(4):20160011. DOI: 10.1098/rsfs.2016.0011.

REFERENCES

1. McCall J. W. The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventives: a review, an update, and recommendations. *Vet. Parasitol.* 2005;133(2–3):197–206. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.04.005.
2. Genchi C., Rinaldi L., Mortarino M., Genchi M., Cringoli G. Climate and Dirofilaria infection in Europe. *Vet. Parasitol.* 2009;163:286–292. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.03.026.
3. Koblinsky K. C., Deus K. M., Butters M. P., Hongyu T., Gray M., DaSilva I. M., Sylla M., Foy B. D. The effect of oral antelmintics on the survivorship and re-feeding frequency of anthropophilic mosquito disease vectors. *Acta Trop.* 2010;116:119–126. DOI: 10.1016/j.actatropica.2010.06.001.
4. Koblinsky K. C., Sylla M., Chapman P. L., Sarr M. D., Foy B. D. Ivermectin mass drug administration to human disrupt malaria parasite transmission in Senegalese villages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011;85(1):3–5. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.11-0160.
5. 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(2). DOI: 10.1128/AAC.02005-16.
6. 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.
7. Rashid M., Rashid M. I., Akbar H., Ahmad L., Hassan M. A., Ashraf K., Saeed K., Gharbi M. A systematic review on modelling approaches for economic losses studies caused by parasites and their associated diseases in cattle. *Parasitology*. 2019;146(2):129–141. DOI: 10.1017/S0031182018001282.
8. Ali M. S., Saeed K., Rashid I., Ijaz M., Akbar H., Rashid M., Ashraf K. Anthelmintic Drugs: Their Efficacy and Cost-Effectiveness in Different Parity Cattle. *Parasitol.* 2018;104(1):79–85 DOI: 10.1645/17-4.
9. Belimenko V. V., Samoilovskaya N. A., Novosad E. V., Gulyukin A. M., Makhmadshova Z. A., Khristianovsky P. I. Features of economic damage from echinococcosis in farm animals. *Russian veterinary journal. Farm animals*. 2017;7:15–19. (In Russ.)
10. Ferreira da Silva C., Taline A., de Melo Barbosa R., Cardoso J. C., Morsink M., Barbosa Souto E., Severino P. New Trends in Drug Delivery Systems for Veterinary Applications. *Pharmaceutical Nanotechnology*. 2021;9(1):15–25. DOI: 10.2174/221173850866200613214548.
11. Sasidharan S., Saudagar P. Encapsulation and delivery of antiparasitic drugs: a review. *Medicine*. 2020;323–342. DOI: 10.1016/B978-0-12-819363-1.00017-X.
12. Suslov V. V., Engasheva E. S., Kedik S. A., Shnyak E. A., Maximova P. O. Prolonged forms of anthelmintic drugs. *Russian Journal of Parasitology*. 2016;38:539–546. DOI: 10.12737/23080. (In Russ.)
13. Baiak B. H. B., Lehnen C. R., da Rocha R. A. Anthelmintic resistance in cattle: A systematic review and meta-analysis. *Livestock Science*. 2018;217:127–135. DOI: 10.1016/j.livsci.2018.09.022.
14. Chaudhary K., Patel M. M., Mehta P. J. Long-Acting Injectables: Current Perspectives and Future Promise *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2019;36(2):137–181. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2018025649.
15. Zhavoronok E. S., Kedik S. A., Panov A. V., Petrova E. A., Suslov V. V. Polymer microparticles for medicine and biology. Moscow: ZAO "IFT"; 2014. 480 p. (In Russ.)
16. Beck L. R., Pope V. Z., Tice T. R., Gilley R. M. Long-acting injectable microsphere formulation for the parenteral administration of levonorgestrel. *Advances in Contraception*. 1985;1:119–129. DOI: 10.1007/BF01849793.
17. Nguen T. T. T., Kedik S. A., Suslov V. V., Shnyak E. A., Vorfolomeeva E. V., Nikonorova E. V. Development of a method for preparing polymer microspheres containing immobilized diclofenac. *Fine Chemical Technologies*. 2015;10(4):27–31. (In Russ.)
18. Kedik S. A., Omelchenko O. A., Suslov V. V., Shnyak E. A. Development of a method for the preparation of the naltrexone base encapsulated in polymeric microparticles. *Drug development & registration*. 2018;1:32–35. (In Russ.)
19. Li W., Zhang L., Ge X., Xu B., Zhang W., Qu L., Choi C.-H., Xu J., Zhang A., Lee H., Weitz D. A. Microfluidic fabrication of microparticles for biomedical applications. *The Royal Society of Chemistry Reviews*. 2018;47(15):5646–5683. DOI: 10.1039/c7cs00263g.
20. Wang J., Li Y., Wang X., Wang J., Tian H., Zhao P., Tian Y., Gu Y., Wang L., Wang C. Droplet Microfluidics for the Production of Microparticles and Nanoparticles. *Micromachines*. 2017;8(22):1–23. DOI: 10.3390/mi8010022.
21. Aceves-Serrano L. G., Ordaz-Martinez K. A., Vazquez-Piñon M., Hwang H. Microfluidics for drug delivery systems. *Nanoarchitectonics in Biomedicine*. 2019;55–83. DOI: 10.1016/B978-0-12-816200-2.00002-5.
22. Martino C., deMello A. J. Droplet-based microfluidics for artificial cell eneration: a brief review. *Interface Focus*. 2016;6(4):20160011. DOI: 10.1098/rsfs.2016.0011.
23. 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;46:101–110. DOI: 10.1016/j.jddst.2018.04.014.
24. 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.
25. Lan W., Li S., Luo G. Numerical and experimental investigation of dripping and jetting flow in a coaxial micro-channel. *Chem. Eng. Sci.* 2015;134:76–85. DOI: 10.1016/j.ces.2015.05.004.
26. Vasiliu S., Lungan M. A., Racovita S., Popa M. Porous microparticles based on methacrylic copolymers and gellan as drug delivery systems. *Polymer International*. 2020;69:11:1066–1080. DOI: 10.1002/pi.5917.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-87-93>
УДК 615.011.4



Оригинальная статья / Research article

Изучение влияния полимеров фармацевтического качества на растворение практически нерастворимых субстанций антиретровирусного действия

С. А. Золотов¹, Н. Б. Демина², Е. С. Пономарев¹✉, И. А. Даин¹, А. С. Золотова¹

¹ ООО «АМЕДАРТ», 109316, Россия, г. Москва, Волгоградский проспект, д. 42, корп. 24

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

✉ Контактное лицо: Пономарев Евгений Сергеевич. E-mail: eugene.s.ponomarev@gmail.com

ORCID: С. А. Золотов – <https://orcid.org/0000-0002-1852-7615>; Н. Б. Демина – <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; Е. С. Пономарев – <https://orcid.org/0000-0003-2538-5544>;
И. А. Даин – <https://orcid.org/0000-0002-8101-0758>; А. С. Золотова – <https://orcid.org/0000-0003-2854-1653>.

Статья поступила: 25.10.2021

Статья принята в печать: 22.03.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Многие новые фармацевтические субстанции (ФС) обладают низкой растворимостью, что может негативно сказаться на биодоступности и, как следствие, на терапевтической эффективности. К таким субстанциям относятся следующие антиретровирусные ФС: ритонавир, эфавиренз, этравирин. Для увеличения растворения ФС применяют различные подходы, например, получение твердых дисперсных систем (ТДС), носителями ФС в которых являются полимеры или использование ПАВ. Однако методы, используемые для получения ТДС, имеют ряд недостатков: использование высоких температур, органических растворителей и дорогостоящего оборудования. В свою очередь, ПАВ влияют на работу внутренних органов, обладают раздражающим действием. В качестве альтернативы данным подходам могут быть использованы фармацевтические приемлемые полимеры, более безопасные в сравнении с низкомолекулярными ПАВ, но тем не менее, обладающие поверхностно активными свойствами.

Цель. Изучение влияния полимеров фармацевтического качества на растворение практически нерастворимых антиретровирусных ФС: ритонавира, эфавиренза, этравирина.

Материалы и методы. Фармацевтические субстанции: эфавиренз форма I (ООО «АМЕДАРТ», Россия, серия 010520); эфавиренз стандартный образец (USP № R09740); ритонавир форма I (ООО «АМЕДАРТ», Россия, серия 010320); ритонавир форма II (ООО «АМЕДАРТ», Россия, серия 010320); ритонавир стандартный образец (USP № H0M427); этравирин форма I (ООО «АМЕДАРТ», Россия, серия 010720); этравирин стандартный образец (MSN, Индия, серия ETV/A312/6/01). Растворение субстанций в растворах полимеров изучали на аппарате «Лопастная мешалка» в условиях, рекомендуемых FDA для соответствующих лекарственных препаратов.

Результаты и обсуждение. Установлены факторы влияния: вид полимера, концентрация раствора полимера и pH среды. Характер влияния не однозначен: возможно как увеличение растворения субстанции, так и снижение. Некоторые полимеры, такие как гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, Eudragit® E PO, способны существенно увеличить растворение субстанций, в то время как поливинилпирролидон способен в ряде случаев их заблокировать. Наибольшая степень увеличения растворения ритонавира, эфавиренза и этравирина установлена в растворах Eudragit® E PO.

Заключение. Результаты исследования показали целесообразность определения биодоступности лекарственных форм практически нерастворимых фармацевтических субстанций при включении полимерных вспомогательных веществ в их рецептуры.

Ключевые слова: ритонавир, эфавиренз, этравирин, растворение, вспомогательные вещества, полимеры

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

Вклад авторов. С. А. Золотов и Н. Б. Демина придумали и разработали эксперимент. И. А. Даин и А. С. Золотова провели эксперимент, определили концентрацию субстанций методом ВЭЖХ. С. А. Золотов и Е. С. Пономарев участвовали в обработке данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Золотов С. А., Демина Н. Б., Пономарев Е. С., Даин И. А., Золотова А. С. Изучение влияния полимеров фармацевтического качества на растворение практически нерастворимых субстанций антиретровирусного действия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):87–93. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-87-93>

Study of the Pharmaceutical Grade Polymers effect on the Dissolution of Practically Insoluble Antiretroviral Substances

Sergey A. Zolotov¹, Natalia B. Demina², Evgenii S. Ponomarev¹✉, Igor A. Dain¹, Anna S. Zolotova¹

¹ LLC "AMEDART", 42/24, Volgogradskiy avenue, Moscow, 109316, Russia

² 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: Evgenii S. Ponomarev. E-mail: eugene.s.ponomarev@gmail.com

ORCID: Sergey A. Zolotov – <https://orcid.org/0000-0002-1852-7615>; Natalia B. Demina – <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; Evgenii S. Ponomarev – <https://orcid.org/0000-0003-2538-5544>;
Igor A. Dain – <https://orcid.org/0000-0002-8101-0758>; Anna S. Zolotova – <https://orcid.org/0000-0003-2854-1653>.

Received: 25.10.2021

Revised: 22.03.2022

Published: 25.05.2022

© Золотов С. А., Демина Н. Б., Пономарев Е. С., Даин И. А., Золотова А. С., 2022

© Zolotov S. A., Demina N. B., Ponomarev E. S., Dain I. A., Zolotova A. S., 2022

Abstract

Introduction. Many of new active pharmaceutical ingredients (APIs) have low solubility that can affect bioavailability negatively and therefore therapeutically efficacy as well. These APIs include the following antiretroviral substances: ritonavir, efavirenz, etravirine. There are various approaches to increase the dissolution of the APIs, for example, the preparation of solid dispersion systems (SDS), in which polymer is used as a drug carrier, and the other one is usage of surfactants. However, the techniques used to obtain SDS have a number of disadvantages: high temperatures, organic solvents and expensive equipment. In turn, surfactants affect the work of internal organs, have an irritating effect. Instead of these methods, they use pharmaceutical acceptable polymers, which are safer in comparison with low-molecular-weight surfactants and still act as surface-active agents.

Aim. Study of the pharmaceutical grade polymers effect on the dissolution of practically insoluble antiretroviral substances: ritonavir, efavirenz, etravirine.

Materials and methods. APIs: efavirenz form I (LLC "AMEDART", Russia, batch 010520); efavirenz reference standard (USP No. R09740); ritonavir form I (LLC "AMEDART", Russia, batch 010320); ritonavir form II (LLC "AMEDART", Russia, batch 010320); ritonavir reference standard (USP No. H0M427); etravirine form I (LLC "AMEDART", Russia, batch 010720); etravirine reference standard (MSN, India, batch ETV/A312/6/01). The dissolution of substances in polymer solutions was studied using the Paddle apparatus under the conditions recommended by the FDA for the drugs.

Results and discussion. The nature of the effect, which is, as defined, influenced by the type of polymer, the concentration of the polymer solution and the pH of the medium, is ambivalent. Both a substance dissolution increase and a decrease are possible. Polymers, such as hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, Eudragit® E PO, can significantly increase the dissolution of substances, while polyvinylpyrrolidone can block it in certain cases. The greatest increase in dissolution of ritonavir, efavirenz and etravirine was found in Eudragit® E PO solutions.

Conclusion. The results of the study showed the feasibility of determining the bioavailability of dosage forms of practically insoluble APIs with the inclusion of polymer excipients in their formulations.

Keywords: ritonavir, efavirenz, etravirine, dissolution, excipients, polymers

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. Sergey A. Zolotov and Natalia B. Demina – conceptualization, methodology. Igor A. Dain and Anna S. Zolotova – dissolution investigation, HPLC analysis. Sergey A. Zolotov and Evgenii S. Ponomarev – data analysis. All authors – results evaluation and writing of the article: review and editing.

For citation: Zolotov S. A., Demina N. B., Ponomarev E. S., Dain I. A., Zolotova A. S. Study of the pharmaceutical grade polymers effect on the dissolution of practically insoluble antiretroviral substances. *Drug development & registration*. 2022;11(2):87–93. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-87-93>

ВВЕДЕНИЕ

Большинство новых фармацевтических субстанций (ФС) обладает низкой растворимостью [1], что может негативно сказаться на биодоступности (БД), и, следовательно, на терапевтической эффективности. К таким ФС относятся антиретровирусные: ритонавир (полиморфные формы I, II), эфавиренз (полиморфная форма I), этравирин (полиморфная форма I), которые практически нерастворимы [2–4] и ряд других, которые массово применяются для лечения ВИЧ-инфекции и входят в список одобренных FDA лекарственных препаратов [5].

Увеличить растворение ФС можно с помощью специальных технологий, направленных, например, на снижение кристалличности исходной ФС. К числу таких технологий относится получение твердых дисперсных систем (ТДС), носителями ФС в которых являются полимеры. В виде ТДС выпускаются ЛП Норвир® содержащий ритонавир и сополимер винилацетата/повидона [6, 7], а также Интеленс®, содержащий этравирин и водорастворимую гидроксипропилметилцеллюлозу (НРМС) [8, 9]. Для получения ТДС разработано множество методов: горячей экструзии, распылительной сушки, испарения растворителя и др. [10]. Следует отметить, что они могут быть связаны с использованием высоких температур и орга-

нических растворителей, что может привести к потере эффективности продукта, а необходимое для осуществления процесса специфическое дорогостоящее оборудование влияет на экономику.

Для повышения растворимости ФС иногда в препараты включают ПАВ, наиболее часто это – лаурилсульфат натрия (ЛСН), как, например, в таблетках, покрытых оболочкой Стокрин®, содержащих эфавиренз [11]. Известно, что ЛСН не является индифферентным веществом, он негативно влияет на клеточные мембраны, работу внутренних органов, например печени и селезенки, обладает раздражающим действием и т. д. [12, 13]. Поэтому поиск альтернативных соединений актуален и возможен.

Частыми компонентами ЛФ являются фармацевтические приемлемые полимеры, более безопасные в сравнении с низкомолекулярными ПАВ, но тем не менее, обладающие поверхностно активными свойствами [14–18] и способные повлиять на поведение ФС [4].

С одной стороны, растворы полимеров могут снижать поверхностное натяжение, тем самым способствуя более быстрому растворению частиц ФС за счет смачивания. Образование химических связей между функциональными группами полимера и ФС может привести к увеличенному растворению последней. С

другой стороны, следует учесть, что растворы полимеров могут и снижать растворение ФС за счет увеличения вязкости, а также изменения взаимодействия между молекулой ФС и молекулами растворителя. К сожалению, вопросы взаимодействия ФС и вспомогательных веществ полимерной структуры недостаточно освещены в научных публикациях. Из-за сложности и многогранности возможных реакций изучение влияния полимера на свойства каждой ФС следует изучать индивидуально, что позволит научно обосновать рецептуру для создания эффективной ЛФ.

Целью работы является изучения влияния водных растворов фармацевтических приемлемых полимеров на растворение практически нерастворимых ФС: ритонавира (полиморфные формы I, II) эфавиренза (полиморфная форма I), этравирина (полиморфная форма I) при физиологическом значении температуры и pH для обоснования рецептуры инновационного ЛП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили:

- эфавиренз форма I (EFA) (ООО «АМЕДАРТ», Россия, серия 010520);
- эфавиренз стандартный образец (USP № R09740);
- ритонавир форма I (RIT I) (ООО «АМЕДАРТ», Россия, серия 010320);
- ритонавир форма II (RIT II) (ООО «АМЕДАРТ», Россия, серия 010320);
- ритонавир стандартный образец (USP № H0M427);
- этравирин форма I (ETR) (ООО «АМЕДАРТ», Россия, серия 010720);
- этравирин стандартный образец (MSN, Индия, серия ETV/A312/6/01);

Структурные формулы практически нерастворимых ФС представлены в таблице 1.

Полимеры: поливинилпирролидон Plasdone™ (PVP): PVP K-12, PVP K-17, PVP K-25, PVP K-29/32, PVP K-90 (Ashland Inc., США); гидроксипропилцеллюлоза Klucel™ (HPC): HPC ELF, HPC EF, HPC LF (Ashland Inc., США);

гидроксипропилметилцеллюлоза Tylopur® (HPMC): HPMC 603, HPMC 606, HPMC 615 (Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Япония); аминотакриллат сополимер Eudragit® E PO (EPO) (Evonik Industries AG, Германия); сополимер ПВП/винилацетата Kollidon® VA 64 (VA 64), сополимер ПЭГ-6000/винилкапролактама/винилацетата Soluplus® (SOLU) (BASF, Германия) (таблица 2).

Растворение субстанций оценивали по концентрации насыщенного раствора за определенный промежуток времени, используя в качестве растворителей (ОФС.1.3.0003.15):

- 0,1 Н раствор хлористоводородной кислоты pH 1,2;
- 0,05 М фосфатный буферный раствор pH 4,5;
- фосфатный буферный раствор pH 6,8.

Растворы полимеров готовили в концентрации 0,1 и 1,0 % (масс.).

В связи с тем, что Eudragit® E PO не растворим при pH выше 5,0, его растворяли при pH = 4,0 в 10⁻⁴ М растворе хлористоводородной кислоты, далее на основе этого раствора готовили буферный раствор с pH 6,8, полимер не выпадал в осадок в течение более 12 часов.

Исследуемые ФС растворяли в указанных выше растворителях или растворах полимеров в приборе для теста «Растворение» Evolution 6100 (Distek, Inc., США), аппарат II «Лопастная мешалка» при объеме среды растворения 900 мл. Для получения насыщенного раствора ФС добавляли в среду растворения ее избыток и определяли количество субстанции, перешедшее в среду растворения через промежуток времени, указанный в таблице 3. Условия проведения теста растворения по параметрам время отбора пробы, скорость вращения и температура соответствовали рекомендациям FDA для ЛП на основе испытуемых ФС [19]. Через указанный промежуток времени пробу отбирали и фильтровали через мембранный фильтр 0,45 мкм, отбрасывая первые 3 мл фильтрата. Далее определяли концентрацию растворенной ФС с помощью ВЭЖХ. Условия получения растворов и количественного определения ФС указаны в таблице 3.

Таблица 1. Структурные формулы эфавиренза, ритонавира, этравирина

Table 1. Efavirenz, ritonavir, etravirine structural formulas

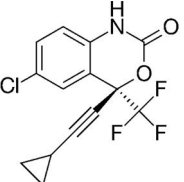
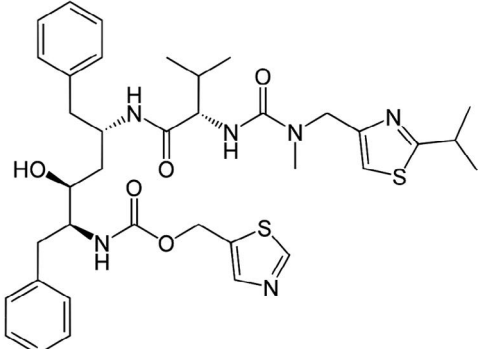
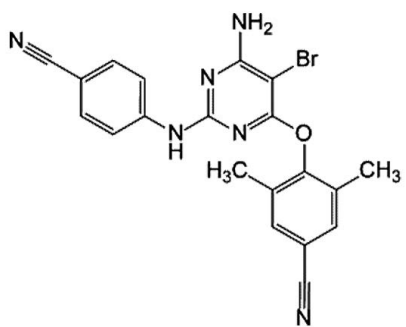
Эфавиренз Efavirenz	Ритонавир Ritonavir	Этравирин Etravirine
		

Таблица 2. Структурные формулы PVP, HPMC, HPC, EPO, VA64, SOLU

Table 2. PVP, HPMC, HPC, Eudragit® EPO, Kollidon® VA64, Soluplus® structural formulas

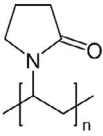
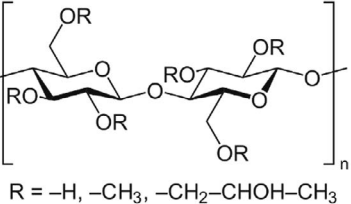
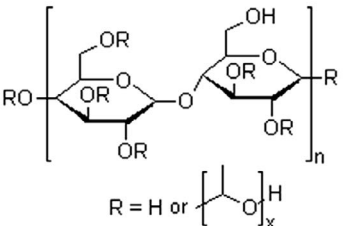
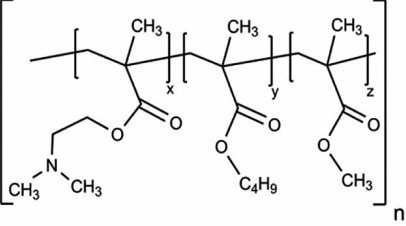
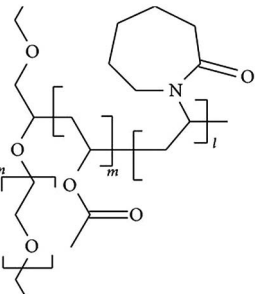
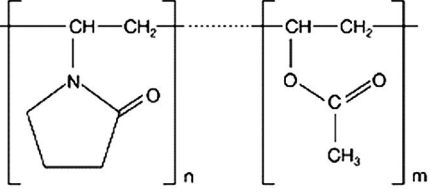
PVP	HPMC	HPC
	 R = -H, -CH ₃ , -CH ₂ -CHOH-CH ₃	 R = H or $\left[\text{CH}_2 - \text{CH}(\text{OH}) - \text{O} \right]_x \text{H}$
EPO	SOLU	VA 64
		

Таблица 3. Условия растворения и анализа ФС

Table 3. APIs dissolution and analysis conditions

ФС API	Температура/объем среды растворения Temperature/dissolution medium volume	Время отбора пробы, мин Time, min	Скорость вращения, об/мин Rotation speed, rpm	Методика определения КО ФС в среде растворения API assay method in a dissolution medium
Эфавиренз I Efavirenz (form I)	37 °C/900 мл 37 °C/900 ml	30	50	[20]
Ритонавир I и II Ritonavir (forms I and II)		120	75	[21]
Этравирин I Etravirine (form I)		60	70	[4]

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все исследуемые субстанции очень мало или практически не растворимы в биологическом интервале pH, об этом свидетельствуют данные таблицы 4. Стоит отметить, что RIT I лучше растворим в изученном диапазоне pH, чем RIT II, что согласуется с данными научных публикаций [22]. Все данные получены в трех повторностях, относительное стандартное отклонение не превышает 3 %.

Таблица 4. Результаты определения концентраций насыщенных растворов ФС

Table 4. Results of API saturated solutions concentration assay

ФС API	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
	мкг/мл µg/ml		
EFA I	12,00	11,40	10,80
RIT I	377,18	16,63	0,24
RIT II	98,842	0,053	0,047
ETR II	$0,85 \cdot 10^{-3}$	$1,26 \cdot 10^{-3}$	$2,47 \cdot 10^{-3}$

В таблице 5 представлены растворения EFA в водных растворах фармацевтических полимеров, выраженные в % от определенной экспериментально концентрации насыщенного раствора ФС в соответствующем растворителе.

Из представленных данных наглядно видно, что при pH 1,2 и концентрации полимера 0,1 % увеличивают растворение EFA только сополимеры EPO, SOLU и VA 64. При увеличении концентрации полимера до 1,0 % все изученные полимеры увеличивают растворение ФС, за исключением HPMC всех марок, которая, наоборот, незначительно понижает растворение EFA. При pH 4,5 все полимеры увеличивают растворение EFA пропорционально росту концентрации полимера. Исключением остаются HPMC 615, HPC ELF и HPC EF, которые в концентрации 0,1 % положительно влияют на растворение ФС, а при дальнейшем увеличении концентрации этих полимеров до 1,0 % растворение субстанции снижается, в целом оставаясь

Таблица 5. Влияние фармацевтических полимеров на растворение EFA

Table 5. Pharmaceutical polymers influence on efavirenz dissolution

Полимер Polymer	pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
	Концентрация раствора полимера, % (масс.) Concentration of polymer solution by weight, %					
	0,1	1,0	0,1	1,0	0,1	1,0
	Увеличение концентрации насыщенного раствора EFA (%) в растворе полимера Increase in the concentration of an EFA saturated solution (%) in a polymer solution					
PVP K-12	92,3	105,0	297,2	432,5	41,3	85,9
PVP K-17	82,6	105,8	299,9	473,6	42,8	86,0
PVP K-25	80,0	110,0	295,7	487,7	37,3	67,3
PVP K-30	78,5	107,5	305,9	453,5	33,9	56,5
PVP K-90	80,8	110,8	302,4	406,1	57,8	86,1
HPMC 603	80,6	87,5	295,6	325,4	37,9	43,8
HPMC 606	84,3	95,8	288,9	323,7	38,4	51,2
HPMC 615	81,3	95,8	295,3	279,6	39,0	39,1
HPC ELF	82,7	163,3	309,8	248,9	39,6	36,5
HPC EF	84,7	175,8	291,7	223,2	41,5	42,5
HPC LF	84,4	154,2	266,3	648,8	41,3	33,7
VA 64	198,9	219,2	344,5	916,7	47,7	83,3
EPO	1174,4	5459,2	2130,3	8345,0	1840,8	8989,4
SOLU	946,1	3823,3	346,5	920,4	49,4	7,2

ясь высокой в сравнении с раствором ФС в растворителе, приготовленном без полимера. При pH 6,8 все полимеры понижают растворение EFA, за исключением EPO, который значительно увеличивает растворение ФС. По совокупности полученных данных лидером по увеличению растворения EFA в изученном диапазоне pH является сополимер EPO.

В таблице 6 представлены результаты растворения RIT I и RIT II в водных растворах фармацевтических полимеров, выраженные в % от определенной

экспериментально концентрации насыщенного раствора ФС в соответствующем растворителе.

Из таблицы 6 видно, что при pH 1,2 растворение RIT I повышается в 0,1 и 1,0 % растворах всех полимеров в 1,5–2,0 раза, а растворение RIT II, – наоборот, существенно снижается.

При pH 4,5 растворы 0,1 % полимеров в целом повышают растворение обеих форм RIT, причем растворение RIT II увеличивается значительно от 35 до 77 раз. Влияние 1,0 % растворов полимеров

Таблица 6. Влияние фармацевтических полимеров на растворение RIT I и RIT II

Table 6. Pharmaceutical polymers influence on ritonavir (form I and form II) dissolution.

Полимер Polymer	pH 1,2				pH 4,5				pH 6,8			
	Концентрация раствора полимера, % (масс.) Concentration of polymer solution by weight, %											
	0,1		1,0		0,1		1,0		0,1		1,0	
	Форма ФС API form											
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
	Увеличение концентрации насыщенного раствора ФС (%) в растворе полимера Increase in the concentration of an API saturated solution (%) in a polymer solution											
PVP K-12	190,4	29,0	177,8	23,8	126,8	3773,6	91,3	5471,7	1212,5	0,0	300,0	0,0
PVP K-17	192,3	26,5	183,4	24,1	141,9	3962,3	92,8	4150,9	1054,2	0,0	206,2	0,0
PVP K-25	196,6	30,7	174,4	26,2	129,0	3962,3	80,6	5471,7	1643,7	0,0	1066,7	0,0
PVP K-30	198,9	30,1	176,7	25,4	135,0	3584,9	83,5	5283,0	1342,8	0,0	333,3	0,0
PVP K-90	198,7	26,2	204,0	19,5	142,8	0,0	93,2	0,0	1362,5	0,0	442,0	0,0
HPMC 603	180,4	24,1	181,3	21,5	146,4	6037,7	159,9	6981,1	1100,0	851,1	345,8	468,1
HPMC 606	180,9	26,1	188,0	24,6	158,1	5471,7	167,2	8301,9	725,0	851,1	462,5	617,0
HPMC 615	176,9	24,1	177,0	24,6	146,8	5660,4	155,7	6603,8	1416,7	851,1	375,0	383,0
HPC ELF	181,5	28,2	195,4	28,5	120,6	4339,6	69,8	7735,8	591,7	1489,4	416,7	446,8
HPC EF	181,7	28,4	192,9	28,9	114,3	5471,7	76,3	7735,8	550,0	638,3	370,8	510,6
HPC LF	167,3	27,9	180,8	28,9	136,4	5094,3	82,1	7547,2	500,0	638,3	420,8	510,6
VA 64	187,3	30,6	209,7	32,0	158,7	5849,1	191,6	6792,5	883,3	638,3	700,0	361,7
EPO	199,0	24,8	292,1	5,5	223,8	7735,8	500,4	28679,2	1687,5	1489,4	9650,0	8276,6
SOLU	182,6	21,9	199,7	24,4	156,9	4717,0	164,8	4905,7	922,5	201,7	604,2	191,5

с pH 4,5 не однозначно. Положительное влияние на растворимость RIT I демонстрируют НРМС всех марок и сополимеры VA 64, EPO, SOLU, остальные полимеры в разной степени снижают растворимость ФС. Растворимость RIT II во всех образцах существенно возросла, наибольшее влияние оказывает EPO. Исключением стал ПВП 90, который в обоих концентрациях блокирует растворимость RIT II.

При pH 6,8 растворение RIT I увеличено в растворах всех полимеров. Повышение концентрации полимера до 1,0 % носит обратную зависимость: растворимость RIT I увеличена по сравнению с растворимостью ФС в соответствующем растворителе, но в меньшей степени, чем в 0,1 % растворах полимеров. Исключение составляет EPO, который увеличивает растворение RIT I и показал наилучшие результаты в концентрации 1,0 %.

RIT II не растворяется в растворах ПВП всех марок, остальные полимеры увеличивают его растворимость. Рост концентрации полимера носит тот же характер, что и для RIT I.

В таблице 7 представлены результаты растворения ETR в водных растворах фармацевтических сополимеров, выраженные в % от определенной экспериментально концентрации насыщенного раствора ФС в соответствующем растворителе.

Таблица 7. Влияние сополимеров на растворение ETR

Table 7. Copolymers influence on etravirine dissolution

Полимер Polymer	pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
	Концентрация раствора полимера, % (масс.) Concentration of polymer solution by weight, %					
	0,1	1,0	0,1	1,0	0,1	1,0
	Увеличение концентрации насыщенного раствора ETR (%) в растворе полимера Increase in the concentration of an ETR saturated solution (%) in a polymer solution					
	VA 64	321,9	511,2	301,3	367,8	144,7
EPO	745,3	1459,2	630,3	1165,6	899,8	1903,1
SOLU	542,3	873,0	341,2	711,4	445,3	577,1

PVP, НРМС и НРС не зависимо от молекулярной массы блокировали растворение ETR. Увеличение растворения ETR обеспечили сополимеры: VA 64, SOLU, EPO пропорционально росту концентрации. Как и в предыдущих экспериментах наилучшие результаты получены в растворах EPO.

Если проанализировать данные таблиц 5–7, то можно сделать вывод, что сополимеры практически везде лучше влияют на растворимость практически нерастворимых EFA, RIT и ETR. Возможно, это связано с образованием комплексов ФС-сополимер, которые обладают более высокой гидрофильностью, чем сама ФС, за счет взаимодействия функциональных групп ФС и функциональных групп сополимера, количество которых выше, чем в индивидуальном полимере.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности включения вспомогательных веществ полимерной структуры в ЛФ практи-

чески нерастворимых ФС для повышения растворения последних. Это решение экономически обосновано, так как не нуждается в особом аппаратном оформлении и может быть осуществлено в процессе получения ЛФ без дополнительных технологических операций и стадий.

При включении полимеров в рецептуры ЛФ с практически нерастворимыми ФС следует учитывать, что они способны оказать не только положительное влияние на растворение ФС, но также понизить и даже заблокировать его, став причиной снижения биодоступности ЛП. Некоторые полимеры, такие как Eudragit® E PO, НРМС, НРС, способны существенно увеличить растворимость субстанции, что требует определения биодоступности при включении этих вспомогательных веществ в состав ЛФ.

Поэтому вид и содержание полимера в ЛФ должны быть научно обоснованы на этапе фармацевтической разработки с учетом значения pH места растворения ЛФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов изучено влияние фармацевтически приемлемых полимеров на растворение ФС этравирина, ритонавира, эфавиренза в растворах с физиологическим значением pH. Показано, что факторами влияния являются: вид полимера, концентрация раствора полимера и pH среды. Характер влияния установленных факторов не однозначен: возможно как значительное увеличение растворения субстанции, так и снижение. Для дальнейших исследований с целью создания инновационных ЛП наиболее перспективен Eudragit® E PO, в растворах которого установлена наибольшая степень увеличения растворения используемых в работе фармацевтических субстанций.

ЛИТЕРАТУРА

- Göke K., Lorenz T., Repanas A., Schneider F., Steiner D., Baumann K., Bunjes H., Dietzel A., Finke J. H., Glasmacher B., Kwade A. Novel strategies for the formulation and processing of poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018;126:40–56. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.05.008.
- Lavra Z. M. M., Pereira de Santana D., Ré M. I. Solubility and dissolution performances of spray-dried solid dispersion of Efavirenz in Soluplus. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017;43(1):42–54. DOI: 10.1080/03639045.2016.1205598.
- Morris J. B., Tisi D. A., Tan D. C. T., Worthington J. H. Development and Palatability Assessment of Norvir® (Ritonavir) 100 mg Powder for Pediatric Population. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(7):1718. DOI: 10.3390/ijms20071718.
- Zolotov S. A., Demina N. B., Zolotova A. S. Influence of Water-Soluble Pharmaceutically Acceptable Polymers on the Solubility of Darunavir and Darunavir Ethanolate. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;54(12):1274–1277. DOI: 10.1007/s11094-021-02354-8.
- HIV Treatment: U.S. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/human-immunodeficiency-virus-hiv/hiv-treatment>. Accessed: 23.10.2021.
- Norvir Drug label information. Available at: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=2849298e-de6e-47bb-8194-56e075b33fc3>. Accessed: 23.10.2021.

- Розенберг Й., Райнхольд У., Липольд Б., Берндль Г., Брайтенбах Й., Алани Л., Гхош С. Твердая фармацевтическая дозированная форма. Евразийский патент на изобретение № EA 011924 B1. 30.06.2009. Доступно по: <http://www.eapat.com/Data/EATXT/eapo2009/PDF/011924.pdf>. Ссылка активна на 23.10.2021.
- Intelence Drug label information. Available at: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=6a9cbc29-9f15-4b24-8d86-206b82887f3d>. Accessed: 23.10.2021.
- Кикенс Ф. Р. И., Ворспулс Ж. Ф. М., Барт Л. Э. К. Способ получения препаратов TMC125, полученных сушкой распылением. Патент РФ на изобретение № RU 2406502 C2. 20.12.2010. Доступно по: https://new.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2406502&TypeFile=html. Ссылка активна на 23.10.2021.
- Bhujbal S. V., Mitra B., Jain U., Gong Y., Agrawal A., Karki S., Taylor L. S., Kumar S., Zhou Q. Pharmaceutical amorphous solid dispersion: A review of manufacturing strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021;11(8):2505–2536. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.05.014.
- Стокрин® инструкция по применению: Справочник лекарственных средств. Доступно по: https://www.vidal.ru/drugs/stocrin__37564%2012. Ссылка активна на 23.10.2021.
- Paul T. J., Taylor T., Babu R. S. A. Sodium lauryl sulphate. *British dental journal*. 2019;227(12):1012. DOI: 10.1038/s41415-019-1108-7.
- Гхош И., Чжан Ц.-А. Оральные составы деферазирокса. Евразийский патент на изобретение № EA 031719 B1. 28.02.2019. Доступно по: <http://www.eapat.com/Data/EATXT/eapo2019/PDF/031719.pdf>. Ссылка активна на 23.10.2021.
- Águila-Hernández J., Trejo A., García-Flores B. E. Volumetric and Surface Tension Behavior of Aqueous Solutions of Polyvinylpyrrolidone in the Range (288 to 303) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2011;56(5):2371–2378. DOI: 10.1021/jc101330b.
- Mezdour S., Cuvelier G., Cash M. J., Michon C. Surface rheological properties of hydroxypropyl cellulose at air–water interface. *Food Hydrocolloids*. 2007;21(5-6):776–781. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2006.09.011.
- Nasatto P., Pignon F., Silveira J., Duarte M., Nosedo M., Rinaudo M. Interfacial Properties of Methylcelluloses: The Influence of Molar Mass. *Polymers*. 2014;6(12):2961–2973. DOI: 10.3390/polym6122961.
- Tanida S., Kurokawa T., Sato H., Kadota K., Tozuka Y. Evaluation of the micellization mechanism of an amphipathic graft copolymer with enhanced solubility of ipriflavone. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2016;64(1):68–72. DOI: 10.1248/cpb.c15-00655.
- Demina N. B. Current Trends in the Development of Technologies for Matrix Formulations with Modified Release. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016;50(7):475–480. DOI: 10.1007/s11094-016-1472-4.
- Dissolution Methods. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/CDER/dissolution/dsp_getallData.cfm. Accessed: 23.10.2021.
- Захода О. Ю., Садчикова Н. П., Демина Н. Б., Золотов С. А., Золотова А. С., Краснюк И. И. Определение количественного содержания эфавиренза методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2020;2:65–72.
- United States Pharmacopeial Convention. The United States pharmacopeia. The national formulary. USP 43rd rev., NF 38th ed. V. 2. North Bethesda: The Convention; 2020. P. 3912–3914.
- Chemburkar S. R., Bauer J., Deming K., Spiwek H., Patel K., Morris J., Henry R., Spanton S., Dziki W., Porter W., Quick J., Bauer P., Donaubaauer J., Narayanan B. A., Soldani M., Riley D., McFarland K. Dealing with the Impact of Ritonavir Polymorphs on the Late Stages of Bulk Drug Process Development. *Organic Process Research & Development*. 2000;4(5):413–417. DOI: 10.1021/op000023y.
- Morris J. B., Tisi D. A., Tan D. C. T., Worthington J. H. Development and Palatability Assessment of Norvir® (Ritonavir) 100 mg Powder for Pediatric Population. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(7):1718. DOI: 10.3390/ijms20071718.
- Zolotov S. A., Demina N. B., Zolotova A. S. Influence of Water-Soluble Pharmaceutically Acceptable Polymers on the Solubility of Darunavir and Darunavir Ethanolate. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;54(12):1274–1277. DOI: 10.1007/s11094-021-02354-8.
- HIV Treatment: U.S. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/human-immunodeficiency-virus-hiv/hiv-treatment>. Accessed: 23.10.2021.
- Norvir Drug label information. Available at: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=2849298e-de6e-47bb-8194-56e075b33fc3>. Accessed: 23.10.2021.
- Rosenberg J., Reinhold U., Liepold B., Derndt G., Breitenbach J., Alani L., Ghosh S. Solid pharmaceutical dosage form. Eurasian Patent № EA 011924 B1. 30.06.2009. Available at: <http://www.eapat.com/Data/EATXT/eapo2009/PDF/011924.pdf>. Accessed: 23.10.2021. (In Russ.)
- Intelence Drug label information. Available at: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=6a9cbc29-9f15-4b24-8d86-206b82887f3d>. Accessed: 23.10.2021.
- Kiekens F. R. I., Voorspoels J. F. M., Baert L. E. C. TMC 125 preparation spray drying production process. Russian Patent № RU 2406502 C2. 20.12.2010. Available at: https://new.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2406502&TypeFile=html. Accessed: 23.10.2021. (In Russ.)
- Bhujbal S. V., Mitra B., Jain U., Gong Y., Agrawal A., Karki S., Taylor L. S., Kumar S., Zhou Q. Pharmaceutical amorphous solid dispersion: A review of manufacturing strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021;11(8):2505–2536. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.05.014.
- Stocrin® instructions for use: Reference book of medicines. Available at: https://www.vidal.ru/drugs/stocrin__37564%2012. Accessed: 23.10.2021. (In Russ.)
- Paul T. J., Taylor T., Babu R. S. A. Sodium lauryl sulphate. *British dental journal*. 2019;227(12):1012. DOI: 10.1038/s41415-019-1108-7.
- Ghosh I., Zhang J.-A. Oral formulations of deferazirox. Eurasian Patent № EA 031719 B1. 28.02.2019. Available at: <http://www.eapat.com/Data/EATXT/eapo2019/PDF/031719.pdf>. Accessed: 23.10.2021. (In Russ.)
- Águila-Hernández J., Trejo A., García-Flores B. E. Volumetric and Surface Tension Behavior of Aqueous Solutions of Polyvinylpyrrolidone in the Range (288 to 303) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2011;56(5):2371–2378. DOI: 10.1021/jc101330b.
- Mezdour S., Cuvelier G., Cash M. J., Michon C. Surface rheological properties of hydroxypropyl cellulose at air–water interface. *Food Hydrocolloids*. 2007;21(5-6):776–781. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2006.09.011.
- Nasatto P., Pignon F., Silveira J., Duarte M., Nosedo M., Rinaudo M. Interfacial Properties of Methylcelluloses: The Influence of Molar Mass. *Polymers*. 2014;6(12):2961–2973. DOI: 10.3390/polym6122961.
- Tanida S., Kurokawa T., Sato H., Kadota K., Tozuka Y. Evaluation of the micellization mechanism of an amphipathic graft copolymer with enhanced solubility of ipriflavone. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2016;64(1):68–72. DOI: 10.1248/cpb.c15-00655.
- Demina N. B. Current Trends in the Development of Technologies for Matrix Formulations with Modified Release. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016;50(7):475–480. DOI: 10.1007/s11094-016-1472-4.
- Dissolution Methods. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/CDER/dissolution/dsp_getallData.cfm. Accessed: 23.10.2021.
- Zakhoda O. Yu., Sadchikova N. P., Demina N. B., Zolotov S. A., Zolotova A. S., Krasnyuk I. I. Determination of the quantitative content of efavirenz by high-performance liquid chromatography with an ultraviolet detector. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2020;2:65–72. (In Russ.)
- United States Pharmacopeial Convention. The United States pharmacopeia. The national formulary. USP 43rd rev., NF 38th ed. V. 2. North Bethesda: The Convention; 2020. P. 3912–3914.
- Chemburkar S. R., Bauer J., Deming K., Spiwek H., Patel K., Morris J., Henry R., Spanton S., Dziki W., Porter W., Quick J., Bauer P., Donaubaauer J., Narayanan B. A., Soldani M., Riley D., McFarland K. Dealing with the Impact of Ritonavir Polymorphs on the Late Stages of Bulk Drug Process Development. *Organic Process Research & Development*. 2000;4(5):413–417. DOI: 10.1021/op000023y.

REFERENCES

- Göke K., Lorenz T., Repanas A., Schneider F., Steiner D., Baumann K., Bunjes H., Dietzel A., Finke J. H., Glasmacher B., Kwade A. Novel strategies for the formulation and processing of poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018;126:40–56. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.05.008.
- Lavra Z. M. M., Pereira de Santana D., Ré M. I. Solubility and dissolution performances of spray-dried solid dispersion of Efavirenz in Soluplus. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017;43(1):42–54. DOI: 10.1080/03639045.2016.1205598.

Фармацевтико-технологическое исследование адсорбированного жидкого растительного экстракта антимикробного действия

А. С. Гуленков¹✉, П. Г. Мизина¹, Е. О. Бахрушина², А. И. Бардаков², А. В. Нюдочкин²

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

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

✉ Контактное лицо: Гуленков Александр Сергеевич. E-mail: gulenkov@vilarnii.ru

ORCID: А. С. Гуленков – <https://orcid.org/0000-0002-1532-9330>; П. Г. Мизина – <https://orcid.org/0000-0001-6510-9603>; Е. О. Бахрушина – <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>;
А. И. Бардаков – <https://orcid.org/0000-0002-4749-3231>; А. В. Нюдочкин – <https://orcid.org/0000-0002-8028-1636>.

Статья поступила: 18.03.2022

Статья принята в печать: 27.04.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Использование комбинированного растительного экстракта цветков ромашки, календулы и травы тысячелистника (патент RU 1 561 262 С) может быть эффективно против различных штаммов микроорганизмов, в том числе вызывающих воспалительные заболевания полости рта. В статье представлены результаты сравнительного фармацевтико-технологического исследования адсорбированного жидкого растительного экстракта на сорбентах различной природы, для последующего введения в состав таблеток для рассасывания.

Цель. Выбрать с помощью метода SeDeM expert system оптимальный сорбент для комбинированного жидкого растительного экстракта цветков ромашки, календулы и травы тысячелистника, обеспечивающий его пригодность для прямого прессования.

Материалы и методы. В качестве активной фармацевтической субстанции использовали адсорбированный на органических (микрористаллические целлюлозы различных марок) и неорганических (кремния диоксиде коллоидном различных марок) сорбентах жидкий комбинированный растительный экстракт противовоспалительного и антибактериального действия цветков ромашки аптечной, цветков календулы лекарственной и травы тысячелистника обыкновенного. Фармацевтико-технологический анализ включал в себя изучение таких технологических параметров, как: насыпная плотность до уплотнения ($D_a = m/V_a$), насыпная плотность после уплотнения ($D_c = m/V_c$), межчастичная пористость ($I_e = (D_c - D_a)/(D_c \cdot D_a)$), индекс Карра ($I_C = (D_c - D_a)/(D_c \cdot 100)$), прессуемость (I_{cd}), индекс Хауснера ($I_H = D_c/D_a$), угол естественного откоса ($Tga = h/r$), сыпучесть (t), влажность (%LoD), гигроскопичность (%H), содержание частиц менее 50 мкм (%Pf), индекс гомогенности ($I\Theta = Fm/100 + \Delta Fmn^\circ$).

Результаты и обсуждение. Провели комплексное фармацевтико-технологическое исследование сорбентов жидкого растительного экстракта до и после адсорбции, результаты которого обработали и представили методом SeDeM expert system, который позволяет охарактеризовать сыпучие материалы с позиции пригодности для прямого прессования, установить факторы, которые первостепенно требуют корректировки путём введения вспомогательных веществ. Установили, что адсорбция экстракта положительного влияет на объёмный фактор ($D = (V_{da} + V_{dc})/2$) всех изученных сорбентов, что может быть связано с изменением фракционного состава вследствие агрегации мелких частиц при адсорбции и деструкции крупных при просеивании готовых смесей через сито с диаметром ячеек 200 мкм (рекомендованный размер нерастворимых частиц для применения в полости рта). Отрицательное влияние на фактор устойчивости ($S = (V_{\%LoD} + V_{\%H})/2$) зафиксировали также для всех образцов, вне зависимости от их природы, что вероятно объясняется остаточной влажностью после высушивания и высокой гигроскопичностью адсорбированных комплексов растительных биологически активных веществ. Изменения фактора сжимаемости ($C = (V_{ie} + V_{ic} + V_{icd})/3$), фактора сыпучести ($F = (V_{ih} + V_a + V_i)/3$) и фактора дозирования ($Dos = (V_{\%Pf} + V_{\%H})/2$) носят индивидуальный характер.

Заключение. В результате проведенных исследований, для введения комбинированного жидкого растительного экстракта цветков ромашки аптечной, цветков календулы лекарственной и травы тысячелистника обыкновенного в состав таблеток, предназначенных для рассасывания, можно рекомендовать неорганический сорбент Aeroperl 300 и органический сорбент Pharmacel 112.

Ключевые слова: SeDeM expert system, ротокан, сорбция, адсорбция, вспомогательные вещества, прямое прессование, твердые лекарственные формы, ромашка аптечная, календула лекарственная, тысячелистник обыкновенный

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

Вклад авторов. П. Г. Мизина и А. С. Гуленков составили и разработали эксперимент. А. С. Гуленков, Е. О. Бахрушина, А. И. Бардаков и А. В. Нюдочкин провели эксперименты по фармацевтико-технологическому изучению экспериментальных образцов. П. Г. Мизина, А. С. Гуленков участвовали в обработке данных. Все авторы участвовали в написании текста статьи и в обсуждении результатов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках темы НИР № FNSZ-2019-0010 «Поиск активных фракций природных соединений, разработка способов их получения из растительного сырья, методик стандартизации и создание на их основе современных лекарственных форм».

Благодарность. Авторы выражают благодарность АО «ФПК ФармВИЛАР» – эксклюзивному дистрибьютеру продукции DFE Pharma и Evonik за предоставленные образцы вспомогательных веществ. Авторы выражают благодарность ЗАО «ВИФИТЕХ» за предоставление образцов жидкого растительного экстракта цветков ромашки аптечной, цветков календулы лекарственной и травы тысячелистника обыкновенного (Ротокан).

Для цитирования: Гуленков А. С., Мизина П. Г., Бахрушина Е. О., Бардаков А. И., Нюдочкин А. В. Фармацевтико-технологическое исследование адсорбированного жидкого растительного экстракта антимикробного действия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):94–101. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-94-101>

Pharmaceutical-technological Study of Adsorbed Liquid Plant Extract of Antimicrobial Activity

Alexander S. Gulenkov¹✉, Praskovya G. Mizina¹, Elena O. Bakhrushina²,
Alexander I. Bardakov², Arseniy V. Nyudochkin²

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

² 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: Alexander S. Gulenkov. E-mail: gulenkov@vilarnii.ru

ORCID: Alexander S. Gulenkov – <https://orcid.org/0000-0002-1532-9330>; Praskovya G. Mizina – <https://orcid.org/0000-0001-6510-9603>;
Elena O. Bakhrushina – <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>; Alexander I. Bardakov – <https://orcid.org/0000-0002-4749-3231>;
Arseniy V. Nyudochkin – <https://orcid.org/0000-0002-8028-1636>.

Received: 18.03.2022 Revised: 27.04.2022 Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. The use of a combined herbal extract of chamomile flowers, calendula flowers and yarrow herb (patent RU 1 561 262 C) can be effective against various microbial strains, including those causing inflammatory diseases of the oral cavity. The article presents the results of a comparative pharmaceutical and technological study of an adsorbed liquid plant extract on sorbents of various nature for subsequent introduction into the composition of orodispersible tablets.

Aim. To select the optimal sorbent of liquid plant extract of chamomile flowers, calendula and yarrow herb ensuring the suitability of the active pharmaceutical ingredient for direct compression, by analyzing using the SeDeM expert system method.

Materials and methods. Active pharmaceutical ingredient was adsorbed on organic (microcrystalline celluloses of various brands) and inorganic (colloidal silicon dioxide of various brands) sorbents, a liquid combined plant extract of anti-inflammatory and antibacterial action of chamomile flowers, calendula flowers and yarrow herb. Pharmaceutical-technological analysis included the study of such technological parameters as: Bulk Density ($Da = m/Va$), Tapped Density ($Dc = m/Vc$), Inter-particle Porosity ($Ie = (Dc - Da)/(Dc \cdot Da)$), Carr index ($IC = (Dc - Da)/(Dc \cdot 100)$), Cohesion Index (Icd), Hausner Index ratio ($IH = Dc/Da$), Angle of Repose ($Tga = h/r$), Powder Flow (t), Loss of Drying ($\%LoD$), Hygroscopicity ($\%H$), Particles $<50 \mu m$ ($\%Pf$), Homogeneity Index ($I\Theta = Fm/100 + \Delta Fmna$).

Results and discussion. A comprehensive pharmaceutical-technological study of sorbents of liquid plant extract before and after adsorption was carried out, the results of which were processed and presented by the SeDeM expert system method. It was found that the adsorption of the extract has a positive effect on the Dimension ($ID = (Da \cdot Dc)/2$) of all studied sorbents which may be related to change in the fractional composition due to the aggregation of small particles during adsorption and destruction of large ones when sifting the finished mixtures through a sieve with a mesh diameter of $200 \mu m$ (recommended insoluble particle size for use in the oral cavity). A negative effect on the Stability ($IS = (\%LoD \cdot \%H)/2$) was also recorded for all samples, regardless of their nature, which is probably explained by residual moisture after drying and high hygroscopicity of adsorbed plant bioactive substances. Changes in the Compressibility ($IC = (Ie \cdot IC \cdot Icd)/3$), Flowability ($IF = (IH \cdot \alpha \cdot t)/3$) and Dosage ($IDos = (\%Pf \cdot I\Theta)/2$) are individual.

Conclusion. The SeDeM expert system method makes it possible to characterize bulk materials from the point of view of suitability for direct compression, to establish the factors that need to be primarily corrected by the introduction of auxiliary substances. As a result of the conducted studies, Aeroperl 300 (inorganic sorbent) and Pharmacel 112 (organic sorbent) can be recommended for the introduction of liquid plant extract of chamomile flowers, calendula flowers and yarrow herb into the composition of orodispersible tablets.

Keywords: SeDeM expert system, sorption, adsorption, excipients, direct compression, solid dosage forms, *Matricaria chamomilla*, *Calendula officinalis*, *Achillea millefolium*

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. Praskovya G. Mizina and Alexander S. Gulenkov compiled and developed an experiment. Alexander S. Gulenkov, Elena O. Bakhrushina, Alexander I. Bardakov and Arseniy V. Nyudochkin conducted experiments on the pharmaceutical-technological study of experimental samples. Praskovya G. Mizina, Alexander S. Gulenkov participated in data processing. All authors participated in writing the text of the article and in discussing the results.

Funding. The work was carried out within the framework of the research project № FNSZ-2019-0010 "Search for active fractions of natural compounds, development of methods for their production from plant materials, standardization methods and the creation of modern dosage forms based on them."

Acknowledgment. The authors express their gratitude to FPC PharmVILAR JSC, the exclusive distributor of DFE Pharma and Evonik products, for providing samples of excipients. The authors express their gratitude to CJSC VIFITECH for providing samples of the liquid plant extract of chamomile flowers, calendula officinalis flowers and common yarrow herb (Rotokan).

For citation: Gulenkov A. S., Mizina P. G., Bakhrushina E. O., Bardakov A. I., Nyudochkin A. V. Pharmaceutical-technological study of adsorbed liquid plant extract of antimicrobial activity. *Drug development & registration*. 2022;11(2):94–101. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-94-101>

ВВЕДЕНИЕ

Разработка и обоснование состава твердых лекарственных форм, может осуществляться эмпирическим путем, что может оказывать негативное влияние на качество разработки, приводить к усложнению и увеличению технологических стадий, которые, следуя

концепции «quality by design» не были бы включены в технологический процесс [1].

Наиболее технологичным способом получения таблетированных форм является прямое прессование, использование которого позволяет снизить расходы на производственные площади (за счет минимализации оборудования), электроэнергию (из-за

отсутствия стадии гранулирования и сушки), рабочую силу [2], при этом отсутствие жидкостей в технологическом процессе особенно важно при разработке лекарственных препаратов с гигроскопичными активными фармацевтическими ингредиентами (АФИ), такими как лекарственные растительные экстракты и др. [3]. Однако одним из важнейших элементов разработки технологии получения таблеток методом прямого прессования является выбор вспомогательных веществ, которому посвящена данная статья [4].

Для оптимизации состава исследователи применяют функцию желательности Харрингтона, заключающуюся в преобразовании натуральных значений экспериментальных данных в безразмерную шкалу желательности или предпочтительности. Несмотря на возможность ранжирования значимости исследуемых параметров, важной особенностью данного метода является субъективная оценка экспериментатора в отношении желательности того или иного параметра [5].

Для сыпучих материалов, подлежащих прессованию, альтернативой выступает разработанный в университете Барселоны метод SeDeM [6] (System Expert for Development of Medicines), который не стоит путать с «Sediment Delivery Model» [7], моделью, используемой при анализе водной эрозии в землепользовании [8].

SeDeM expert system заключается в оценке 12 технологических параметров сыпучего материала (насыпная плотность до уплотнения, насыпная плотность после уплотнения, межчастичная пористость, прессуемость, индекс Хауснера, индекс Карра, сыпучесть, угол естественного откоса, влажность, гигроскопичность, содержание частиц менее 50 мкм и индекс однородности) по которым рассчитываются 5 факторов (объемный фактор, сжимаемость, сыпучесть, устойчивость и дозирование). Каждое экспериментальное значение преобразуется в радиус SeDeM диаграмм со значением от 0 до 10 (при рекомендуемом не менее 5), по которым рассчитывают индекс хорошего прессования, характеризующий пригодность состава для прямого прессования [9-11].

Таким образом **цель нашего исследования** – выбрать оптимальный сорбент жидкого растительного экстракта цветков ромашки, календулы и травы тысячелистника, обеспечивающий пригодность АФИ для прямого прессования, путем анализа методом SeDeM expert system.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

АФИ – адсорбированный на органических (микрокристаллические целлюлозы различных марок) и неорганических (кремния диоксиде коллоидном различных марок) сорбентах жидкий комбинированный растительный экстракт противовоспалительного и антибактериального действия цветков ромашки ап-

течной, цветков календулы лекарственной и травы тысячелистника (ЗАО «ВИФИТЕХ») [12]. Выбор адсорбентов был представлен ранее [13]. Адсорбированный растительный экстракт измельчали до прохождения через сито с размером ячеек 200 мкм, в соответствии с рекомендациями по применению нерастворимых частиц в полости рта [14, 15].

В качестве адсорбентов органической природы использовали **микрокристаллическую целлюлозу** [Pharmacel 102 (далее MCC102) и Pharmacel 112 (далее MCC112), DRE Pharma, Германия] и **силицированную микрокристаллическую целлюлозу** [PROSOLV® SMCC 90 (далее SMCC), JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Германия].

В качестве адсорбентов неорганической природы использовали **кремния диоксид коллоидный** [Aerosil® 200 Pharma (далее A200), Aeroperl® 300 Pharma (далее A300) и Aerosil-380 (далее A380), Evonik, Германия, Ph. Eur. 5.0, USP29/NF24, JPE].

Образцы адсорбированного экстракта на различных сорбентах обозначали добавлением R (MCC102-R, MCC112-R, SNCC-R, A200-R, A300-R и A380-R).

Методы

Для расчета **объемного фактора** [(Dimension Incidence) – далее D, по формуле 1] SeDeM диаграмм проводили оценку **насыпной плотности** [до уплотнения (Bulk Density) – далее Da, и после уплотнения (Tapped Density) – далее Dc] по ОФС 1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» на тестере насыпной плотности SWM 102 (ERWEKA GmbH, Германия).

$$D = \frac{10V_{Da} + 10V_{Dc}}{2} = \frac{r_{Da} + r_{Dc}}{2}, \quad (1)$$

где V – значение технологического параметра; r – радиус SeDeM.

Для расчета **фактора сжимаемость** [(Compressibility Incidence) – далее C, по формуле 2] рассчитывали межчастичную пористость (Inter-particle Porosity – далее Ie), индекс Карра (Carr Index – далее IC), а также определяли **прочности таблеток на раздавливание** (далее – Icd) по ОФС.1.4.2.0011.15 «Прочность таблеток на раздавливание» на тестере прочности ТВН 325 (ERWEKA GmbH, Германия). **Прессование таблеток** проводили на однопуансонном эксцентриковом таблеточном прессе (KORSCH AG, Германия) при максимальном усилии сжатия [9].

$$C = \frac{10 \cdot \frac{Dc - Da}{Dc \cdot Da} + \frac{Dc - Da}{Dc \cdot 100} + \frac{V_{Icd}}{20}}{3} = \frac{r_{Ie} + r_{IC} + r_{Icd}}{3}. \quad (2)$$

Для расчета **фактора сыпучести** [(Flowability/Powder Flow) – далее F, по формуле 3] рассчитывали **индексы Хауснера** (Hausner Index ratio – далее IH), определяли **сыпучесть** (Powder Flow – далее t)

по ОФС 1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» и **угол естественного откоса** (Angle of Repose – далее α) в соответствии с 2.9.36. Powder Flow (European Pharmacopoeia – 8th edition) на электронном тестере для измерения сыпучести GTB (ERWEKA GmbH, Германия).

$$F = \frac{\frac{30 - 10 \frac{Dc}{Da}}{2} + \left(10 - \frac{\alpha}{4}\right) + \left(10 - \frac{t}{2}\right)}{3} = \frac{r_{IH} + r_{\alpha} + r_t}{3}. \quad (3)$$

Для расчета **фактора устойчивости** [(Lubricity/Stability) – далее S , по формуле 4] **определяли влажность** (%LoD) на влагомере весовом ML-50 (A&D, Япония) и **гигроскопичность** (%H) в эксикаторе при температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ и относительной влажности $(75 \pm 1)\%$ (термогигрометр ИВА-6Н, НПК «Микрофор», Россия) создаваемой насыщенным раствором натрия хлорида в течение 24 часов [ГОСТ 29244-91 (ISO 483-88)] [9].

$$S = \frac{10 - \frac{10 \cdot \%LoD}{2,5} + \left(10 - \frac{\%H}{2}\right)}{2} = \frac{r_{\%LoD} + r_{\%H}}{2}. \quad (4)$$

Для расчета **фактора дозирования** [(Lubricity/Dosage) – далее Dos , по формуле 5) анализировали **фракционный состав** по ОФС 1.1.0015.15 «Ситовой анализ» на установке для ситового анализа PSS (ERWEKA GmbH, Германия) с комплектом фармакопейных сит (размер ячеек 500 мкм, 315 мкм, 200 мкм, 100 мкм, 50 мкм) (ООО «Крафт», Россия) и определяли

количество частиц <50 мкм (далее – %Pf) и индекс гомогенности (далее – $I\theta$) [6].

$$Dos = \frac{10 - \frac{\%Pf}{5} + 500 \cdot I\theta}{2} = \frac{r_{\%Pf} + r_{I\theta}}{2}. \quad (5)$$

Для оценки пригодности порошка для прямого прессования рассчитывают параметрический индекс (Parameter Index, IP), Параметрический индекс профиля (Parameter Profile Index, IPP), Индекс хорошего прессования (Good Compression Index, GCI) [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты комплексного фармацевтико-технологического исследования неорганических адсорбентов до и после адсорбции жидкого комбинированного экстракта цветков ромашки, календулы и травы тысячелистника представлены в таблице 1, органических адсорбентов в таблице 2.

SeDeM диаграммы сорбентов до и после адсорбции представлены на рисунке 1, значения факторов и индексов оценки пригодности сыпучего материала для прямого прессования неорганических адсорбентов представлены на рисунке 2, органических на рисунке 3.

В результате адсорбции жидкого комбинированного растительного экстракта у всех адсорбентов зафиксировали увеличение объемного фактора (в 7,6 раз для A200; в 2,13 раз для A300; в 7,02 раз для A380; в 1,01 раз для MCC102 и MCC112; в 1,29 раз для SMCC), однако только у A300-R он достигает целевого показателя.

Таблица 1. Технологические характеристики неорганических адсорбентов до и после адсорбции экстракта

Table 1. Parameters of inorganic adsorbents before and after adsorption of the extract

Технологический параметр Parameter	A200	A200-R	A300	A300-R	A380	A380-R
$Da, \text{г/см}^3$	$0,035 \pm 0,001$	$0,266 \pm 0,014$	$0,213 \pm 0,011$	$0,468 \pm 0,017$	$0,039 \pm 0,002$	$0,263 \pm 0,009$
$Dc, \text{г/см}^3$	$0,046 \pm 0,002$	$0,359 \pm 0,015$	$0,275 \pm 0,012$	$0,592 \pm 0,027$	$0,051 \pm 0,002$	$0,369 \pm 0,014$
Ie	$7,000 \pm 0,350$	$0,979 \pm 0,046$	$1,071 \pm 0,043$	$0,450 \pm 0,017$	$5,930 \pm 0,17$	$1,085 \pm 0,052$
$IC, \%$	$24,42 \pm 0,73$	$26,00 \pm 0,68$	$22,78 \pm 1,05$	$21,05 \pm 0,92$	$23,16 \pm 0,79$	$28,57 \pm 1,19$
Icd	–*	$72,0 \pm 3,1$	–*	$60,0 \pm 2,6$	–*	$67,0 \pm 2,5$
IH	$1,32 \pm 0,03$	$1,35 \pm 0,06$	$1,30 \pm 0,04$	$1,27 \pm 0,05$	$1,30 \pm 0,05$	$1,40 \pm 0,07$
$t, \text{с/100г}$	–*	$39,9 \pm 1,9$	$19,4 \pm 0,7$	$12,6 \pm 0,4$	–*	$36,4 \pm 1,4$
$\alpha, ^\circ$	–*	$34,0 \pm 1,1$	$25,0 \pm 0,8$	$25,9 \pm 1,0$	–*	$35,0 \pm 1,0$
%LoD	$0,0 \pm 0,0$	$2,3 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,0$	$1,8 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,0$	$3,0 \pm 0,1$
%H	$3,2 \pm 0,0$	$11,3 \pm 0,4$	$10,0 \pm 0,3$	$17,0 \pm 0,5$	$13,0 \pm 0,4$	$24,2 \pm 0,9$
%Pf	–*	$14,16 \pm 0,69$	$17,40 \pm 0,67$	$24,56 \pm 0,71$	–*	$16,97 \pm 0,73$
$I\theta$	–*	$0,012 \pm 0,000$	$0,027 \pm 0,001$	$0,012 \pm 0,000$	–*	$0,009 \pm 0,000$

Примечание. * Показатель отсутствует или его невозможно измерить. Насыпная плотность до уплотнения (Da); насыпная плотность после уплотнения (Dc); межчастичная пористость (Ie); индекс Карра (IC); прессуемость (Icd); индекс Хауснера (IH); угол естественного откоса (α); сыпучесть (t); влажность (%LoD); гигроскопичность (%H); содержание частиц менее 50 мкм (%Pf); индекс гомогенности ($I\theta$).

Note. * Indicator is missing or impossible to measure. Bulk density (Da); Tapped density (Dc); inter-particle porosity (Ie); Carr index (IC); Cohesion index (Icd); Hausner ratio (IH); angle of repose (α); powder flow (t); loss on drying (%LoD); hygroscopticity (%H); particles <50 μm (%Pf); homogeneity index ($I\theta$).

Таблица 2. Технологические характеристики органических адсорбентов до и после адсорбции экстракта

Table 2. Parameters of organic adsorbents before and after adsorption of the extract

Технологический параметр Parameter	MCC102	MCC102-R	MCC112	MCC112-R	SCMM	SCMM-R
$D_a, \text{г/см}^3$	$0,340 \pm 0,009$	$0,320 \pm 0,009$	$0,365 \pm 0,008$	$0,365 \pm 0,008$	$0,292 \pm 0,007$	$0,339 \pm 0,008$
$D_c, \text{г/см}^3$	$0,450 \pm 0,016$	$0,480 \pm 0,011$	$0,471 \pm 0,016$	$0,479 \pm 0,007$	$0,367 \pm 0,015$	$0,512 \pm 0,017$
Ie	$0,719 \pm 0,022$	$1,041 \pm 0,033$	$0,619 \pm 0,020$	$0,653 \pm 0,022$	$0,692 \pm 0,027$	$0,998 \pm 0,031$
IC, %	$24,44 \pm 0,76$	$33,33 \pm 1,13$	$22,58 \pm 0,61$	$23,81 \pm 0,43$	$20,25 \pm 0,48$	$33,82 \pm 0,81$
Icd	$>200,0$	$>200,0$	$>200,0$	$>200,0$	$>200,0$	$>200,0$
IH	$1,32 \pm 0,03$	$1,50 \pm 0,3$	$1,29 \pm 0,02$	$1,31 \pm 0,03$	$1,25 \pm 0,03$	$1,51 \pm 0,03$
$t, \text{с/100г}$	$15,0 \pm 0,4$	—*	$12,2 \pm 0,3$	$11,1 \pm 0,3$	$14,9 \pm 0,4$	$20,3 \pm 0,3$
$\alpha, ^\circ$	$40,0 \pm 1,7$	—*	$45,0 \pm 1,5$	$43,8 \pm 2,1$	$31,0 \pm 1,2$	$30,7 \pm 1,0$
%LoD	$4,5 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,3$
%H	$6,2 \pm 0,3$	$8,9 \pm 0,4$	$7,3 \pm 0,4$	$11,7 \pm 0,5$	$6,4 \pm 0,4$	$7,4 \pm 0,3$
%Pf	$28,76 \pm 0,67$	$35,81 \pm 0,75$	$18,21 \pm 0,42$	$9,63 \pm 0,38$	$16,85 \pm 0,47$	$39,01 \pm 0,69$
I θ	$0,011 \pm 0,000$	$0,004 \pm 0,000$	$0,011 \pm 0,000$	$0,015 \pm 0,000$	$0,006 \pm 0,000$	$0,005 \pm 0,000$

Примечание. * Показатель отсутствует или его невозможно измерить. Насыпная плотность до уплотнения (D_a); насыпная плотность после уплотнения (D_c); межчастичная пористость (Ie); индекс Карра (IC); прессуемость (Icd); индекс Хауснера (IH); угол естественного откоса (α); сыпучесть (t); влажность (%LoD); гигроскопичность (%H); содержание частиц менее 50 мкм (%Pf); индекс гомогенности (I θ).

Note. * Indicator is missing or impossible to measure. Bulk density (D_a); Tapped density (D_c); inter-particle porosity (Ie); Carr index (IC); Cohesion index (Icd); Hausner ratio (IH); angle of repose (α); powder flow (t); loss on drying (%LoD); hygroscopicity (%H); particles <50 μm (%Pf); homogeneity index (I θ).

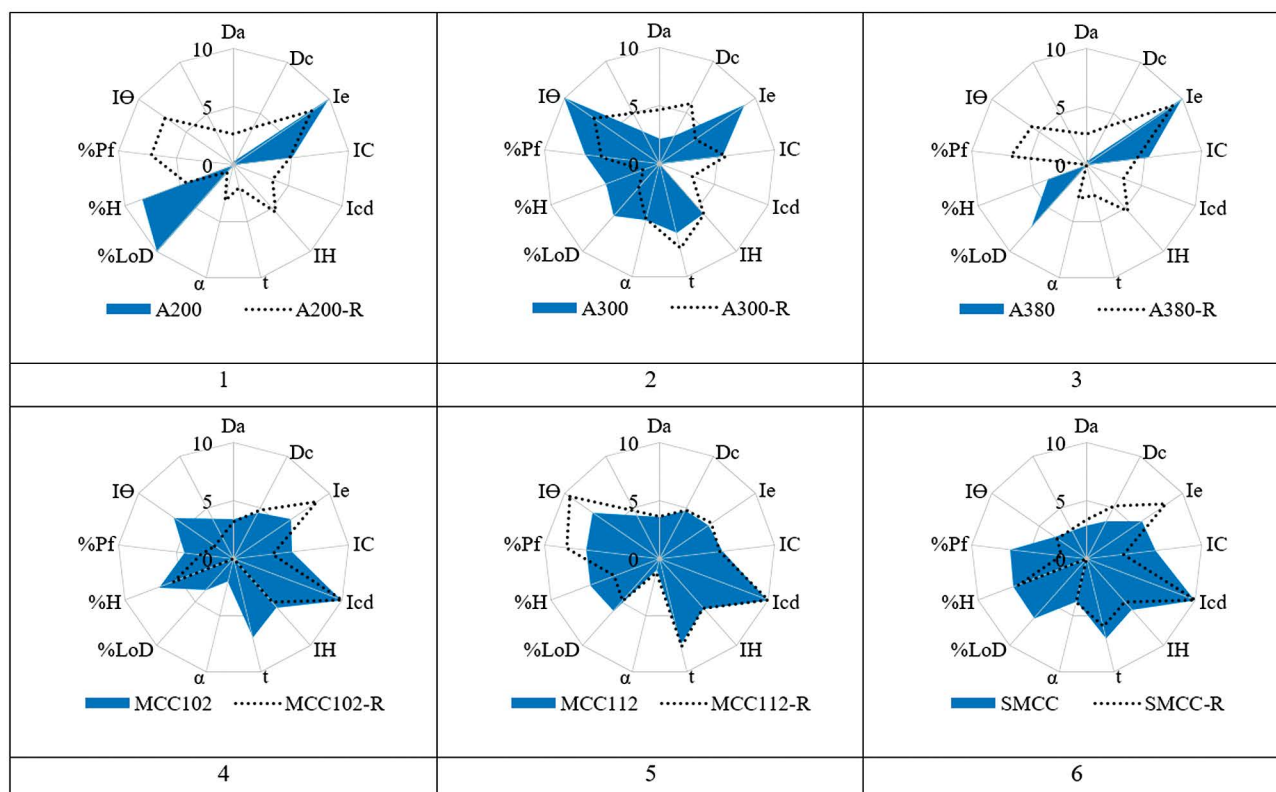


Рисунок 1. SeDeM диаграммы сорбентов до и после адсорбции жидкого растительного экстракта цветков ромашки, календулы и травы тысячелистника:

1 – A200; 2 – A300; 3 – A380; 4 – MCC102; 5 – MCC112; 6 – SMCC

Figure 1. SeDeM diagrams of sorbents before and after adsorption of liquid plant extract of chamomile flowers, calendula flowers and yarrow herb

1 – A200; 2 – A300; 3 – A380; 4 – MCC102; 5 – MCC112; 6 – SMCC



Рисунок 2. Значения факторов и индексов SeDeM неорганических сорбентов до и после адсорбции жидкого растительного экстракта цветков ромашки, календулы и травы тысячелистника

Figure 2. Values of incidences and SeDeM index of inorganic sorbents before and after adsorption of liquid plant extract of chamomile flowers, calendula flowers and yarrow herb

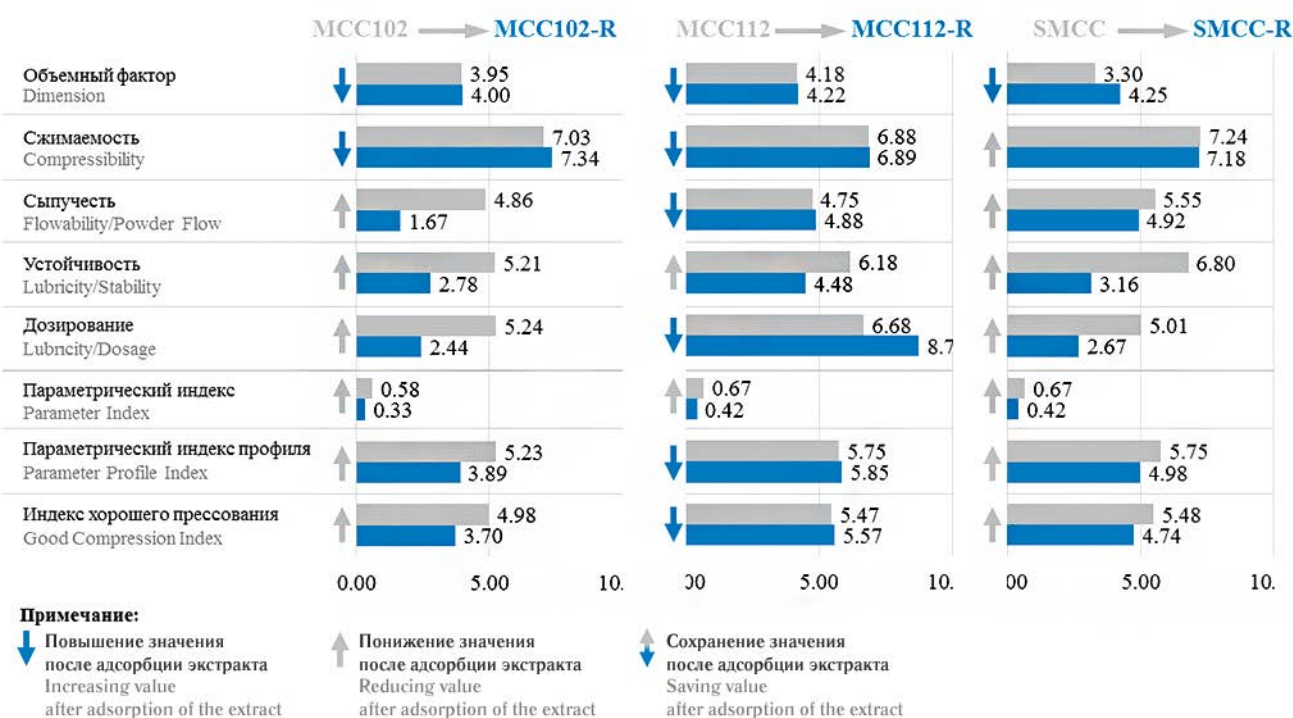


Рисунок 3. Значения факторов и индексов SeDeM органических сорбентов до и после адсорбции жидкого растительного экстракта цветков ромашки, календулы и травы тысячелистника

Figure 3. Values of incidences and SeDeM index of organic sorbents before and after adsorption of liquid plant extract of chamomile flowers, calendula flowers and yarrow herb

Фактор сжимаемость исходных ВВ практически у всех выбранных сорбентов имеет значения выше 5 (A300 = 4,79), в результате сорбции улучшается у A200 (в 1,10 раз), A380 (в 1,09 раз), MCC102 (в 1,04 раз), для MCC112 и SMCC влияние не значительно, а у A300 значения ухудшаются (в 1,15 раза).

Фактор сыпучесть улучшается у всех неорганических адсорбентов (A200 в 1,92 раз; A300 в 1,08 раз; A380 в 1,95 раз) и MCC112 (в 1,03 раз), и ухудшается у MCC102 и SMCC (в 2,91 и 1,13 раз соответственно).

Фактор устойчивость ухудшается для всех выбранных сорбентов (A200 в 3,57 раз; A300 в 2,56 раз; A380 в 5,36 раз; MCC102 в 1,87 раз; MCC112 в 1,38 раз; SMCC в 2,15 раз), за счет повышения влажности и гигроскопичности образцов.

Фактор дозирование улучшается для A200, A380 (до адсорбции экстракта определение фактора невозможно) и MCC112 (в 1,30 раз), и ухудшается у A300 (в 1,38 раз), MCC102 (в 2,15 раз) и SMCC (в 1,88 раз).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод SeDeM позволил охарактеризовать сыпучие материалы с позиции пригодности для прямого прессования, установить факторы, которые первоначально требуют корректировки путём введения вспомогательных веществ.

Среди изученных сорбентов жидкого растительного экстракта неорганической природы, наибольшим индексом хорошего прессования обладает Aeroperl 300 ($CGI_{A300} = 5,04$), который является единственным из изученных веществ, для которого показатель достигает целевых значений (≥ 5). Даже учитывая тот факт, что адсорбция экстракта на A300 негативно влияет на его пригодность к прямому прессованию ($CGI_{A300-R} = 4,56$), его значение превышает подобные для других исследованных сорбентов ($CGI_{A200-R} = 3,63$ и $CGI_{A380-R} = 3,60$).

Среди изученных сорбентов жидкого растительного экстракта органической природы, сопоставимыми значениями индекса хорошего прессования обладают Pharmacel 112 и PROSOLV® SMCC 90 ($CGI_{MCC112} = 5,47$ и $CGI_{SMCC} = 5,48$), однако в результате адсорбции экстракта его значение падает для MCC102 и SMCC.

В результате проведенных исследований, для введения в состав таблеток для рассасывания жидкого растительного экстракта цветков ромашки, цветков календулы и травы тысячелистника можно рекомендовать Aeroperl 300 (неорганический сорбент) и Pharmacel 112 (органический сорбент).

ЛИТЕРАТУРА

1. Yu L. X., Amidon G., Khan M. A., Hoag S. W., Polli J., Raju G. K., Woodcock J. Understanding pharmaceutical quality by design. *The AAPS journal*. 2014;16(4):771–783. DOI: 10.1208/s12248-014-9598-3.

2. Chatteraj S., Sun C. C. Crystal and particle engineering strategies for improving powder compression and flow properties to enable continuous tablet manufacturing by direct compression. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2018;107(4):968–974. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.11.023.
3. Gallo L., Ramírez-Rigo M. V., Piña J., Palma S., Allemandi D., Bucalá V. Valeriana officinalis dry plant extract for direct compression: preparation and characterization. *Scientia pharmaceutica*. 2012;80(4):1013–1026. DOI: 10.3797/scipharm.1206-05.
4. Mura P., Valleri M., Baldanzi S., Mennini N. Characterization and evaluation of the performance of different calcium and magnesium salts as excipients for direct compression. *International journal of pharmaceutics*. 2019;567:118454. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118454.
5. Юдина Д. В., Блинская Е. В., Алексеев К. В., Минаев С. В., Марахова А. И. Разработка состава таблеток ГМЛ-1, полученных методом влажного гранулирования: выбор наполнителя и связующего. *Фармация*. 2018;67(3):35–40. DOI: 10.29296/25419218-2018-03-07.
6. Suñe Negre J., Roig Carreras M., Fuster García R., Hernández Pérez C., Ruhi Roura R., García Montoya E., Tico Grau J. R. Nueva metodología de preformulación galénica para la caracterización de sustancias en relación a su viabilidad para la compresión: Diagrama SeDeM. *Pharmaceutical Science and Technology*. 2005;15(3):125–136.
7. Коцур Ю. М., Флисюк Е. В. Применение метода SeDeM для оптимизации состава таблеток (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(3):38–42. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-3-38-42.
8. Imad F., Anis Z., Mohamed M. Assessment of the effects of land use/land cover changes on soil loss and sediment yield using WaTEM/SEDEM model: case study of ziz upper watershed in SE-Morocco. *Current Applied Science and Technology*. 2021:337–350.
9. Dai S., Xu B., Shi G., Liu J., Zhang Z., Shi X., Qiao Y. SeDeM expert system for directly compressed tablet formulation: A review and new perspectives. *Powder Technology*. 2018;342:517–527. DOI: 10.1016/j.powtec.2018.10.027.
10. Zhang Y., Li Y., Wu F., Hong Y., Shen L., Lin X., Feng Y. Texture and surface feature-mediated striking improvements on multiple direct compaction properties of Zingiberis Rhizoma extracted powder by coprocessing with nano-silica. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;603:120703. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120703.
11. Mamidi H. K., Mishra S. M., Rohera B. D. Application of modified SeDeM expert diagram system for selection of direct compression excipient for liquisolid formulation of Neusilin® US2. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021;64:102506. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102506.
12. Соколов С. Я., Багинская А. И., Сакович Г. С., Белова Л. Ф., Лескова Т. Е., Колхир В. К., Городнюк Т. И., Рыбалко К. С., Коновалова О. А., Мартынова Р. Г. Состав, обладающий противовоспалительной активностью «Ротокан». Патент РФ на изобретение RU 1 561 262 C. 13.10.1980. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU1561262C/ru/> Ссылка активна на 14.04.2022.
13. Гуленков А. С., Мизина П. Г. Сорбция и десорбция жидкого растительного экстракта. *Фармация*. 2019;68(4):27–31. DOI: 10.29296/25419218-2019-04-04.
14. Bowles B. J., Dziemidowicz K., Lopez F. L., Orlu M., Tuleu C., Edwards A. J., Ernest T. B. Co-processed excipients for dispersible tablets—part 1: Manufacturability. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(6):2598–2609. DOI: 10.1208/s12249-018-1090-4.
15. Dziemidowicz K., Lopez F. L., Bowles B. J., Edwards A. J., Ernest T. B., Orlu M., Tuleu C. Co-Processed Excipients for Dispersible Tablets—Part 2: Patient Acceptability. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(6):2646–2657. DOI: 10.1208/s12249-018-1104-2.

REFERENCES

1. Yu L. X., Amidon G., Khan M. A., Hoag S. W., Polli J., Raju G. K., Woodcock J. Understanding pharmaceutical quality by design. *The AAPS journal*. 2014;16(4):771–783. DOI: 10.1208/s12248-014-9598-3.

2. Chatteraj S., Sun C. C. Crystal and particle engineering strategies for improving powder compression and flow properties to enable continuous tablet manufacturing by direct compression. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2018;107(4):968–974. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.11.023.
3. Gallo L., Ramírez-Rigo M. V., Piña J., Palma S., Allemandi D., Bucalá V. Valeriana officinalis dry plant extract for direct compression: preparation and characterization. *Scientia pharmaceutica*. 2012;80(4):1013–1026. DOI: 10.3797/scipfarm.1206-05.
4. Mura P., Valleri M., Baldanzi S., Mennini N. Characterization and evaluation of the performance of different calcium and magnesium salts as excipients for direct compression. *International journal of pharmaceutics*. 2019;567:118454. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118454.
5. Yudina D. V., Blynskaya E. V., Alekseev K. V., Minaev S. V., Marakhova A. I. Development of the composition of GML-1 tablets obtained by wet granulation: the choice of filler and binder. *Pharmacy*. 2018;67(3):35–40. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2018-03-07.
6. Suñe Negre J., Roig Carreras M., Fuster García R., Hernández Pérez C., Ruhí Roura R., García Montoya E., Ticó Grau J. R. Nueva metodología de preformulación galénica para la caracterización de sustancias en relación a su viabilidad para la compresión: Diagrama SeDeM. *Pharmaceutical Science and Technology*. 2005;15(3):125–136.
7. Kotsur Yu. M., Flisjuk E. V. Application of SeDeM method for optimization of the formulation of tablets (a review). *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*. 2021;55(3):38–42. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-3-38-42.
8. Imad F., Anis Z., Mohamed M. Assessment of the effects of land use/land cover changes on soil loss and sediment yield using WaTEM/SEDEM model: case study of ziz upper watershed in SE-Morocco. *Current Applied Science and Technology*. 2021:337–350.
9. Dai S., Xu B., Shi G., Liu J., Zhang Z., Shi X., Qiao Y. SeDeM expert system for directly compressed tablet formulation: A review and new perspectives. *Powder Technology*. 2018;342:517–527. DOI: 10.1016/j.powtec.2018.10.027.
10. Zhang Y., Li Y., Wu F., Hong Y., Shen L., Lin X., Feng Y. Texture and surface feature-mediated striking improvements on multiple direct compaction properties of Zingiberis Rhizoma extracted powder by coprocessing with nano-silica. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;603:120703. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120703.
11. Mamidi H. K., Mishra S. M., Rohera B. D. Application of modified SeDeM expert diagram system for selection of direct compression excipient for liquisolid formulation of Neusilin® US2. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021;64:102506. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102506.
12. Sokolov S. Ya., Baginskaya A. I., Sakovich G. S., Belova L. F., Leskova T. E., Kolhir V. K., Gorodnuk T. I., Rybalko K. S., Konovalova O. A., Martynova R. G. The composition with anti-inflammatory activity "Rotokan". Patent RUS № 1 561 262 C. 13.10.1980. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU1561262C/ru/> Accessed: 14.04.2022. (In Russ.)
13. Gulenkov A. S., Mizina P. G. Sorption and desorption of liquid plant extract. *Pharmacy*. 2019;68(4):27–31. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2019-04-04.
14. Bowles B. J., Dziemidowicz K., Lopez F. L., Orlu M., Tuleu C., Edwards A. J., Ernest T. B. Co-processed excipients for dispersible tablets—part 1: Manufacturability. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(6):2598–2609. DOI: 10.1208/s12249-018-1090-4.
15. Dziemidowicz K., Lopez F. L., Bowles B. J., Edwards A. J., Ernest T. B., Orlu M., Tuleu C. Co-Processed Excipients for Dispersible Tablets—Part 2: Patient Acceptability. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(6):2646–2657. DOI: 10.1208/s12249-018-1104-2.

Investigation of the Influence of Formulation Method on Technological Parameters of Gramicidin S and β -cyclodextrin Inclusion Complexes

Aleksandr A. Drannikov^{1,2}✉, Ivan S. Vatlin^{1,2}, Marina E. Trusova¹, Antonio Di Martino¹, Sergei V. Krivoshchekov³, Artem M. Guriev³, Mikhail V. Belousov^{1,3}

¹ National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenin av., Tomsk, 634050, Russia

² JSC "PFK "Obnovlenie", 80, Stacionnaya str., Novosibirsk, 630096, Russia

³ Siberian State Medical University, 2, Moskovskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia

✉ Corresponding author: Aleksandr A. Drannikov. E-mail: alexdr2037@gmail.com

ORCID: Aleksandr A. Drannikov – <https://orcid.org/0000-0002-4839-1667>; Ivan S. Vatlin – <https://orcid.org/0000-0002-7663-7863>; Marina E. Trusova – <https://orcid.org/0000-0002-1761-264X>; Antonio Di Martino – <https://orcid.org/0000-0002-2664-4483>; Sergei V. Krivoshchekov – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>; Artem M. Guriev – <https://orcid.org/0000-0002-1120-4979>; Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Received: 18.03.2022

Revised: 22.04.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. Gramicidin S is a peptide antibiotic that has been widely used for more than 70 years. Gramicidin S is available in the form of tablets with a low dosage, which leads to possible deviations in the "Uniformity of dosage" parameter during manufacturing. Another limitation is the presence of lactose and sucrose in the formulation, which limits the drug application by patients demonstrating intolerance. As an alternative, we propose inclusion complexes of gramicidin S with β -cyclodextrin.

Aim. The work aims to describe the influence of the methodology to prepare the inclusion complex on the characteristics and properties of the final product.

Materials and methods. The gramicidin S – β -cyclodextrin inclusion complex has been prepared by dry mixing, paste complexation, co-precipitation and fluid-bed complexation. The complex formation has been confirmed by ¹H NMR spectroscopy, differential scanning calorimetry and thermogravimetry while the morphology and size by scanning electron microscopy for the solid and dynamic light scattering for the solution. The flowability, slope angle, bulk density of the obtained powders were estimated using the methods described in Russian Pharmacopoeia of the XIV edition.

Results and discussion. In the present work, we prepared a set of gramicidin S and β -cyclodextrin inclusion complexes by various approaches. The thermal analysis demonstrated a significant change in the peak referring to phase transition of the substances, indicating the interaction between the components. The ¹H NMR spectroscopy reveals that the L-ornithine amino group is the part of gramicidin S involved in the complexation. Evaluating the technological properties of gramicidin S and β -cyclodextrin inclusion complexes significant variability, which is associated with the particle morphology. Complexes obtained using co-precipitation and fluid-bed complexation methods are more suitable for producing gramicidin S tablet production by direct compression technology.

Conclusion. Herein, we demonstrate that the formation of the gramicidin S and β -cyclodextrin inclusion complex occurs through the L-ornithine amino group in the gramicidin S. In addition, depending on the method significant differences in the particle size and shape have been observed. The obtained results could provide valuable information for the development of new gramicidin S buccal formulations, which are more consistent in the "Uniformity of dosage" and allow to avoid the use of lactose and sucrose as excipients.

Keywords: gramicidin S, antibiotic, β -cyclodextrin, inclusion complex

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. Aleksandr A. Drannikov, Ivan S. Vatlin developed the experimental design, held the experiment. Aleksandr A. Drannikov, Sergei V. Krivoshchekov analyzed the obtained results. Mikhail V. Belousov, Marina E. Trusova were supervisors of this work. Aleksandr A. Drannikov, Ivan S. Vatlin, Sergei V. Krivoshchekov, Artem M. Guriev Antonio Di Martino prepared the manuscript. All authors took part in the discussion.

For citation: Drannikov A. A., Vatlin I. S., Trusova M. E., Di Martino A., Krivoshchekov S. V., Guriev A. M., Belousov M. V. Investigation of the influence of formulation method on technological parameters of gramicidin S and β -cyclodextrin inclusion complexes. *Drug development & registration*. 2022;11(2):102–108. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-102-108>

Исследование влияния способа получения комплексов включения грамицидина С и β -циклодекстрина на их технологические показатели

А. А. Дранников^{1,2}✉, И. С. Ватлин^{1,2}, М. Е. Трусова¹, А. Ди Мартино¹, С. В. Кривошеков³, А. М. Гурьев³, М. В. Белоусов^{1,3}

¹ Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 30

² АО «Производственная фармацевтическая компания «Обновление», 630096, Россия, г. Томск, ул. Станционная, д. 80

³ Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

✉ Контактное лицо: Дранников Александр Алексеевич. E-mail: alexdr2037@gmail.com

© Drannikov A. A., Vatlin I. S., Trusova M. E., Di Martino A., Krivoshchekov S. V., Guriev A. M., Belousov M. V., 2022

© Дранников А. А., Ватлин И. С., Трусова М. Е., Ди Мартино А., Кривошеков С. В., Гурьев А. М., Белоусов М. В., 2022

ORCID: А. А. Дранников – <https://orcid.org/0000-0002-4839-1667>; И. С. Ватлин – <https://orcid.org/0000-0002-7663-7863>; М. Е. Трусова – <https://orcid.org/0000-0002-1761-264X>;
А. Ди Мартино – <https://orcid.org/0000-0002-2664-4483>; С. В. Кривошеков – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>; А. М. Гурьев – <https://orcid.org/0000-0002-1120-4979>;
М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Статья поступила: 18.03.2022

Статья принята в печать: 22.04.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Антибиотик пептидной природы грамицидин С находит широкое применение протяжении более чем 70 лет. Грамицидин С выпускается в форме таблеток, которые имеют низкую дозировку, что обуславливает риск отклонения по показателю «Однородность дозирования». Содержание в таблетках лактозы и сахарозы, ограничивает применение препарата пациентами с непереносимостью данных компонентов. В качестве альтернативы предлагается образование комплексов включения грамицидина С с β -циклодекстрином.

Цель. Исследовать влияние способов получения комплексов включения грамицидина С и β -циклодекстрина на их технологические показатели

Материалы и методы. Получение комплекса включения грамицидина С и β -циклодекстрина проводили с применением методов сухого смешивания, затирания в пасте, соосаждения, комплексообразования в псевдооживленном слое. Подтверждение образования комплекса проводили, используя ^1H ЯМР-спектроскопию, дифференциальную сканирующую калориметрию и термогравиметрию. Морфологию определяли с применением методов сканирующей электронной микроскопии, динамического рассеяния света. Сыпучесть, угол откоса, насыпную плотность полученных порошков определяли с применением методик, указанных в Государственной фармакопее РФ XIV издания.

Результаты и обсуждение. В ходе работы получен ряд комплексов грамицидина С и β -циклодекстрина с использованием различных способов. Термограммы комплексов включения демонстрируют значительное изменение пика в области, соответствующей фазовому переходу веществ, что явно свидетельствует о наличии взаимодействия между компонентами комплекса включения. Результаты ^1H ЯМР-спектроскопии позволили сделать вывод о комплексообразовании по аминогруппе L-орнитина в молекуле грамицидина С. При исследовании технологических свойств комплексов включения грамицидина С и β -циклодекстрина, установлена значительная вариабельность их технологических параметров, что связано, в том числе, с морфологией частиц. Комплексы, полученные с использованием методов соосаждения и комплексообразования в псевдооживленном слое, могут быть использованы в производстве таблетированных лекарственных форм грамицидина С по технологии прямого прессования.

Заключение. В рамках настоящего исследования установлено, что образование комплекса включения грамицидина С и β -циклодекстрина проходит по аминогруппе L-орнитина в молекуле грамицидина С. Обнаружены существенные различия размеров и формы частиц, что сказывается на значениях технологических параметров комплексов включения, получаемых с использованием различных подходов. Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых буккальных форм грамицидина С, обладающих меньшей вероятностью несоответствия по показателю «Однородность дозирования» и исключающих содержание лактозы и сахарозы.

Ключевые слова: грамицидин С, антибиотик, β -циклодекстрин, комплекс включения

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

Вклад авторов. А. А. Дранников, И. С. Ватлин разработали дизайн исследования, провели исследование. А. А. Дранников, С. В. Кривошеков провели анализ полученных данных. М. В. Белоусов, М. Е. Трусова осуществляли научное руководство исследованием. А. А. Дранников, И. С. Ватлин, С. В. Кривошеков, А. М. Гурьев, А. Ди Мартино подготовили текст статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Дранников А. А., Ватлин И. С., Трусова М. Е., Ди Мартино А., Кривошеков С. В., Гурьев А. М., Белоусов М. В. Исследование влияния способа получения комплексов включения грамицидина С и β -циклодекстрина на их технологические показатели. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):102–108. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-102-108>

INTRODUCTION

Peptide antibiotic gramicidin S is widely used in the treatment of infections caused by gram-positive and gram-negative bacteria, as well as some fungi [1] for more than 70 years of industrial production of the antibiotic without resistance formation [2].

At the same time, fillers such as lactose and sucrose are often used in the composition of gramicidin S lozenges¹, which promotes a potential risk when using the drug by patients with individual intolerance to those excipients.

¹ State register of medicines. Gramicidin S. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx?s=%D0%B3%D1%80%D0%B0%D0%B%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%B4%D0%B8%D0%BD&m=mn>. Accessed: 24.11.2021. (In Russ.)

An additional problem of all tableted dosage forms of gramicidin S is the low dosage of the active ingredient (up to 0.55 wt. % per 1 tablet), which carries high risk of production deviations of the uniformity of dosage parameter meaning. During the manufacturing, the problem is being solved by introducing of an active pharmaceutical ingredient (API) into the composition of the humidifier during the stage of wet granulation of the tablet mixture [3].

One of the possible ways to solve these problems is the formation of inclusion complexes with cyclodextrins – starch derivatives, which form a structure with a hydrophilic outer and hydrophobic inner surface, which polarity is close to that of ethanol. Due to this, poorly soluble substances are incorporated completely or partially into the cavity of cyclodextrin, changing their properties without chemical modification [4].

It was previously shown that the drug encapsulation into β -cyclodextrin cavity improves parameters such as flowability, slope angle and bulk density, as well as increases the API solubility in water [5].

Within this work, we analyzed the influence of various approaches to prepare the inclusion complex of gramicidin S and β -cyclodextrin on the technological properties of the resulting product.

MATERIALS AND METHODS

Gramicidin S dihydrochloride (TS 9348-023-47509455-2012, JSC «PFK Obnovlenie», Russia) was used as an object of this research, excipients – β -cyclodextrin, EP/USP (Roquette Frères, France), ethanol 95 % (Russian Pharmacopeia XIV ed, FS.2.1.0036.15) and purified water (Russian Pharmacopeia XIV ed, FS.2.2.0020.18).

To prepare the gramicidin S and β -cyclodextrin inclusion complex we applied following approaches:

1. Dry mixing method.

500.0 g of β -cyclodextrin, 50.0 g of gramicidin S dihydrochloride and grinding bodies were loaded in the drum of a ceramic ball mill MShK-50 (LLC "Slavyanskaya ceramic company", Ukraine). The resulting mixture was micronizing for 8 hours while maintaining the drum rotation at 20 rpm.

2. Paste complexation.

10.0 g of gramicidin S dihydrochloride was dissolved in 200.0 ml of 95 % ethyl alcohol, obtaining a 5 % solution. The drug solution was filtered through a syringe filter with a pore size of 0.45 μm (GluveX, Russia). The filtrate was slowly added to 100.0 g of β -cyclodextrin with stirring, and then the solvent was removed by evaporation. To remove the residual ethanol content, we dried the resulting mixture was dried at room temperature under a vacuum of 0.1 bar in a VAC-24 drying oven (Stegler, China).

3. Co-precipitation method.

2.0 g of gramicidin S dihydrochloride was dissolved in 40.0 ml of ethanol, resulting a 5 % solution. Separately, 20.0 g of β -cyclodextrin was dissolved in 1000 ml of purified water. The drug solution was added to the β -cyclodextrin solution with stirring on a magnetic stirrer. The resulting solution was sonicated with ODA-M30 (ODA Service, Russia) for 2 minutes to complete the components dissolution, and then filtered through a filter with a pore size of 0.45 μm (GluveX, Russia). The filtrate was cooled to 2–8 °C for 16 hours to obtain the finished complex in the form of a crystalline precipitate, which was then separated by decantation.

4. Fluid-bed complexation.

The complex was obtained in a Glatt GPCG1 Fluid Bed Dryer Granulator (Glatt GmbH, Germany). The value of the volumetric flow rate of the inlet air flow parameter varied in the range from 0 to 100 m^3/h and was regulated by opening or closing the damper. The product temperature was maintained at 60 ± 2 °C by the inlet

air to the chamber, which was set at 80 °C. The pressure applied to the spray nozzle was 2 bar. Water in an amount of 400.0 ml, mixed with gramicidin S to obtain a concentration of 0.05 g/L, was used as a humectant for the granulation process. The feed rate of the granulation mixture was 8 g/min. The loading weight of β -cyclodextrin was 200.0 g.

Confirmation of gramicidin S encapsulation in the β -cyclodextrin cavity was carried out using ^1H NMR spectroscopy using a Bruker BioSpin 500 MHz NMR spectrometer (Bruker Corporation, USA) at a 400 MHz frequency. The chemical shifts value was determined in ppm; tetramethylsilane (Russian Pharmacopeia XIV ed, OFS.1.3.0001.15) was used as a standard.

Additionally, the formation of the complex was confirmed using thermal analysis methods – differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TGA). An STD Q600 V20.9 Build 20 synchronous thermal analyzer (TA Instruments, USA) was used for the analysis.

The morphological features of the obtained samples of the complex of gramicidin S and β -cyclodextrin were determined using a NOVA NANOSEM 450 microscope (FEI Czech Republic s.r.o., Czech Republic) equipped with a vacuum detector. The measurement was carried out at a 5 kV voltage and a pressure of 90 Pa. Images were acquired at an approximation of 10 kx9 with a dot size of 50 nm.

The determination of the particle size of the inclusion complexes was carried out using the method of dynamic light scattering. A Zetasizer Nano ZS device (Malvern Instruments, Great Britain) was used for the work. The particle sizes of the complex were detected in hexane, which is chemically inert with respect to the complex components. Flowability, slope angle, bulk density for the obtained powders were determined using the methods specified in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation of the XIV edition using a flowability tester GT (ERWEKA GmbH, Germany), a funnel diameter of 10 mm, and a tester for determining the bulk density of powders SVM 102 (ERWEKA GmbH, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

During this work, we obtained a number of gramicidin S and β -cyclodextrin inclusion complexes using various approaches: dry mixing, paste complexation, co-precipitation and fluid-bed complexation. As a result, we obtained 4 samples, which were further analyzed by DSC-TGA (figure 1) and ^1H NMR spectroscopy (figure 2) in order to confirm the encapsulation and the interaction sites of the API and β -cyclodextrin. Thermograms of the obtained complexes demonstrate identical character, confirming the interaction of gramicidin S and β -cyclodextrin independently on the complex preparation method.

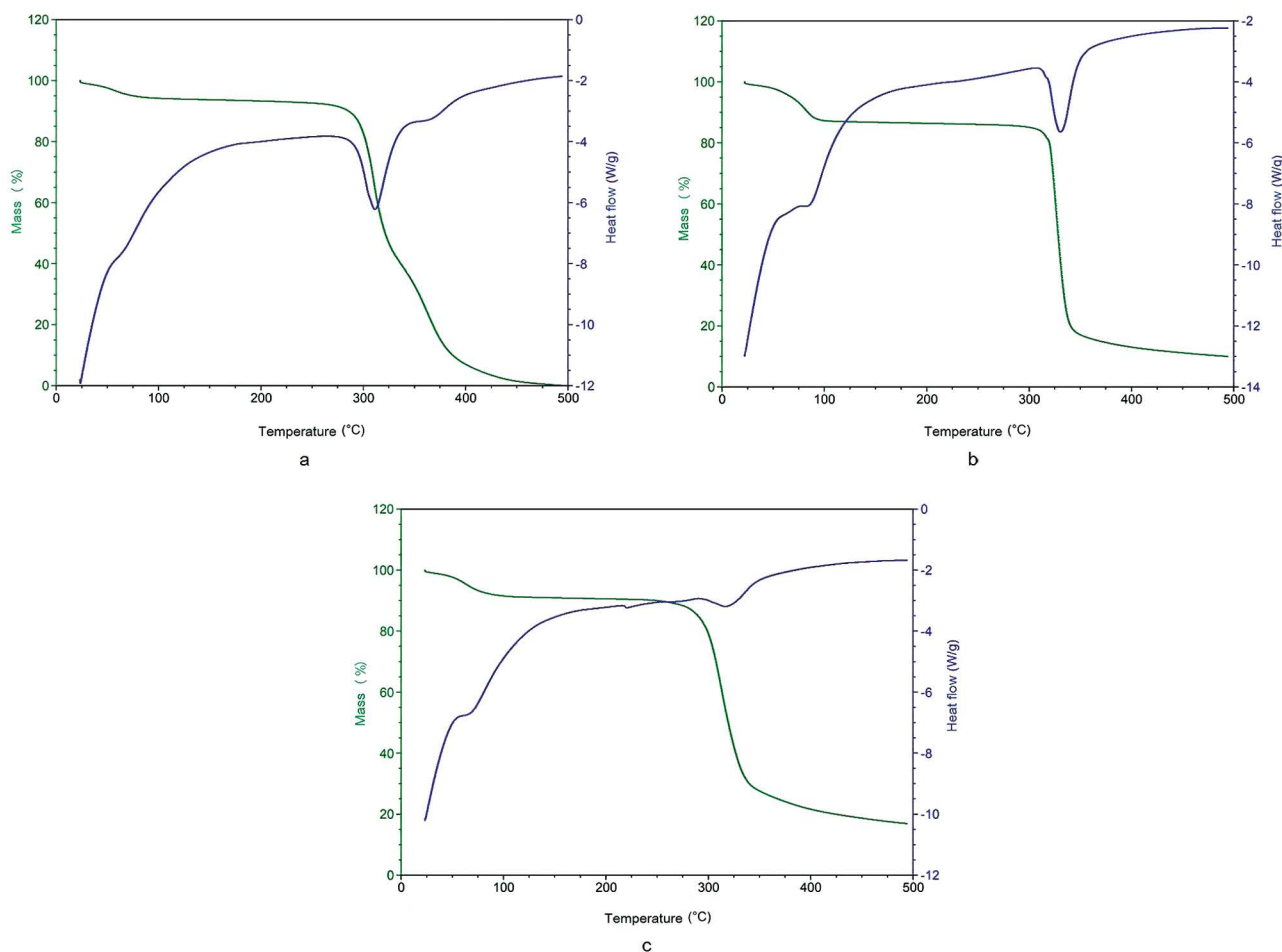


Figure 1. DSC-TGA thermograms of
a – gramicidin S dihydrochloride; **b** – β -cyclodextrin; **c** – inclusion complex of gramicidin S and β -cyclodextrin

In the region of 75–115 °C on the thermogram of β -cyclodextrin (figure 1 b) one can observe the 15 % mass sample decrease is observed, which is associated with the evaporation of residual moisture from the surface of cyclodextrin (85–100 °C) and water molecules located in the polysaccharide cavity (100–115 °C). Further, starting from 300 °C, an endothermic peak is observed, indicating the melting of β -cyclodextrin with its subsequent destruction, which correlates by a significant decrease in the weight of the test sample [6].

On the thermogram of gramicidin S dihydrochloride (figure 1 a), the only endothermic peak is observed starting from 280 °C, which corresponds to the melting point of the peptide. Further heating leads to the sample decomposition.

Comparing the obtained data with the inclusion complex thermogram (figure 1c), a significant change of the peak in the region of 300–340 °C definitely proves the interaction between the drug and polysaccharide, and supposing indicates the complex formation energy.

In order to identify the sites of encapsulation, we analyzed the obtained samples applying ^1H NMR spectroscopy method. Currently it is known that the inclusion

complex formation results in changes of chemical shifts of the encapsulated groups protons [7].

Comparing the chemical shifts of the initial compounds and the final product, a significant change in the chemical value from 7.91 to 7.69 was found for the protons of L-ornithine amino group (figure 2), so we conclude that complexation of gramicidin S molecule takes place.

Summarizing the obtained data, we suggest the following structure of the inclusion complex of gramicidin S and β -cyclodextrin (figure 3).

The ^1H NMR spectra for all the samples obtained via different approaches were identical to that shown in figure 2, so we conclude that the encapsulation of gramicidin S into β -cyclodextrin occurs within the same mechanism following by encapsulation of the same part of the API molecule, regardless of the solvent removal method.

Studying the technological properties of the gramicidin S and β -cyclodextrin inclusion complex mixtures obtained using different approaches we revealed the variability of the parameter meanings (table 1).

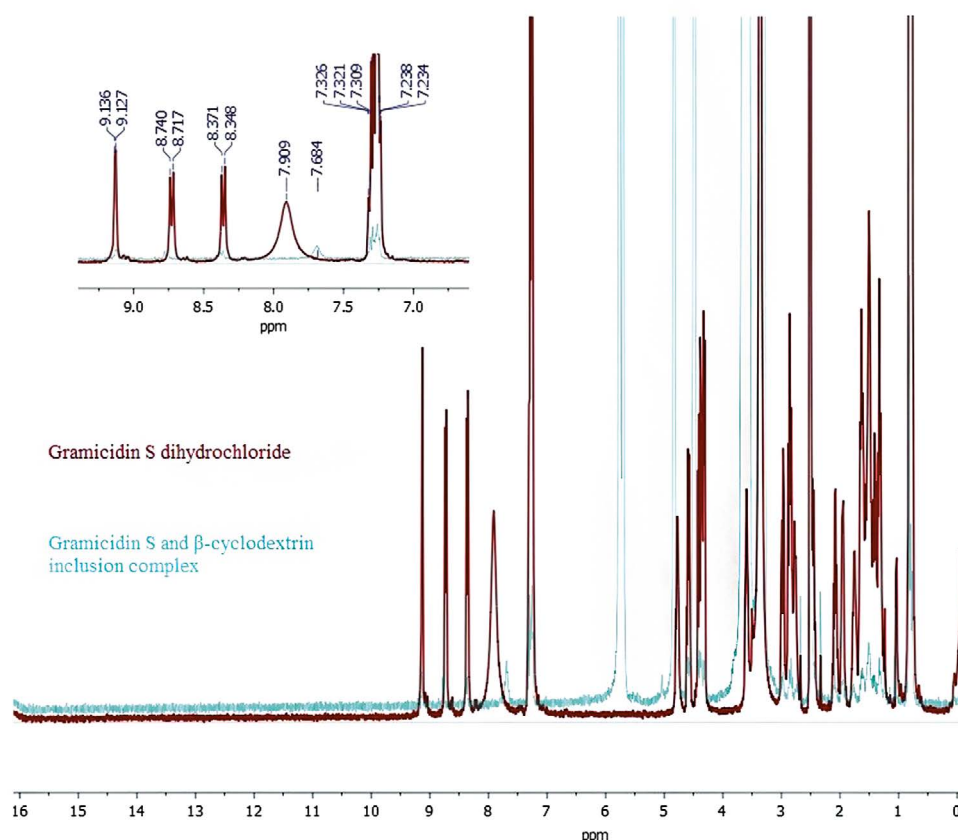


Figure 2. ^1H NMR spectra of gramicidin S dihydrochloride and inclusion complex of gramicidin S and β -cyclodextrin

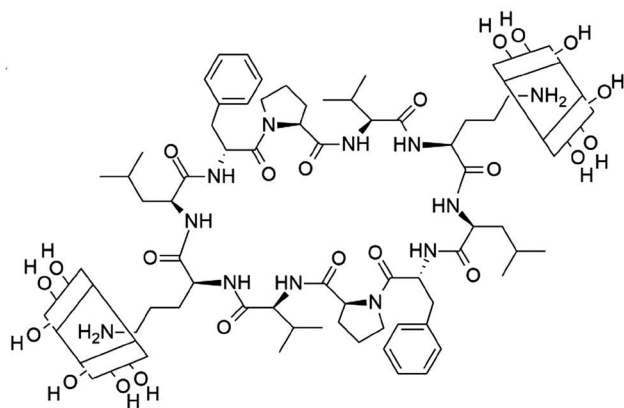


Figure 3. Supposed structural formula of the inclusion complex of gramicidin S and β -cyclodextrin

According to table 1, it can be seen that agglomerates of inclusion complexes obtained using co-precipitation and fluid-bed complexation methods demonstrate good flowability and a slope angle less than 45 degrees, which is a rare property for inclusion complexes of cyclodextrins and poorly soluble substances [8]. The observed variability of technological parameters of products obtained using different approaches can be explained by different particle morphology (figure 4, 5).

Table 1. Technological parameters of gramicidin S and β -cyclodextrin inclusion complexes obtained applying different approaches

Inclusion complex formation method	Flowability, s/100 g	Angle of repose, deg.	Bulk density, g/cm ³
Gramicidin S dihydrochloride	—*	—	0,475 ± 0,05 0,593 ± 0,01 (c*)
Co-precipitation	10,4 ± 0,01	17,5 ± 0,3	0,735 ± 0,05 0,896 ± 0,05 (c)
Dry mixing	—	—	0,755 ± 0,05 0,880 ± 0,05 (c)
Paste complexation	—	—	0,790 ± 0,05 0,900 ± 0,05 (c)
Fluid-bed complexation	19,1 ± 0,01	43,0 ± 0,3	0,600 ± 0,05 0,698 ± 0,05 (c)

Note. «C» – in compressed state.

«-» – can't be determined (no flow).

Figures 4 and 5 show that the application of co-precipitation and fluid-bed complexation methods makes it possible to achieve more uniform distribution of particle size in the resulting inclusion complex mixture reducing the role of internal friction forces, which prevent the flow [9]. The flow is a critical parameter, guaranteeing the uniformity of the granulometric composition of the tablet mixture, uniform filling of the matrices and entry into the compression zone during tableting, ensuring the uniformity of the mass of the dosage form and the stability of its physicochemical properties [10].

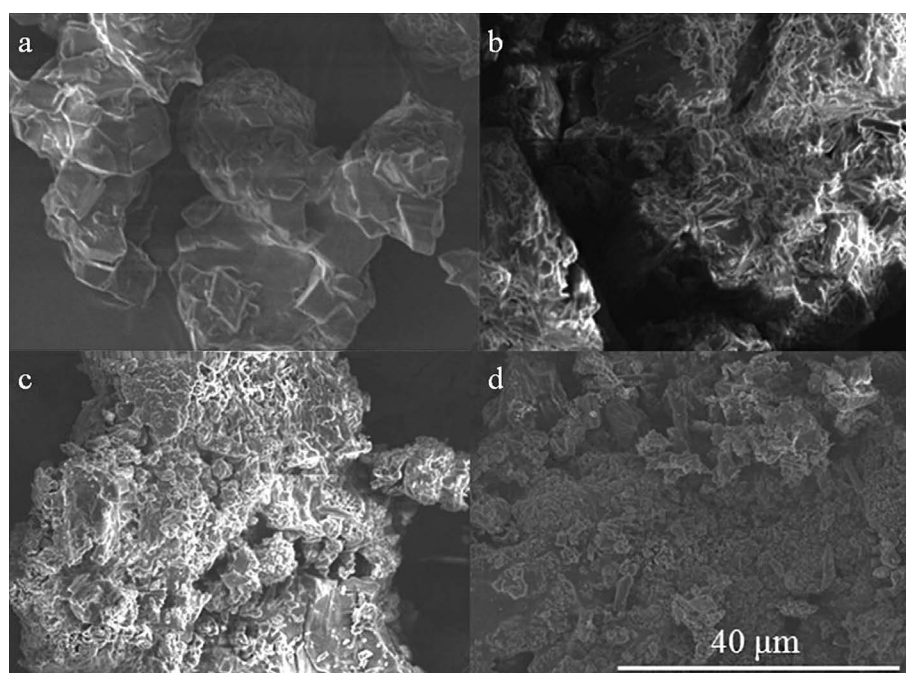


Figure 4. Micrographs of complex particles for obtained by the method:
a – fluid-bed complexation; b – co-precipitation; c – paste complexation, d) dry mixing

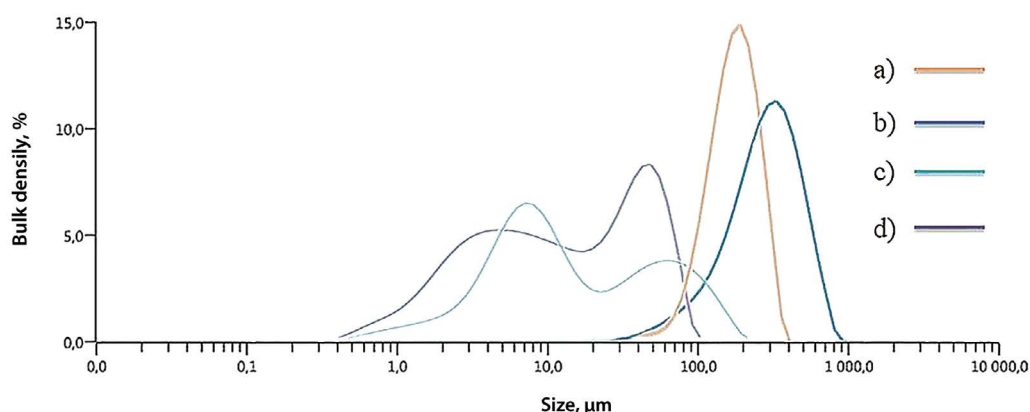


Figure 5. Particle size distribution for inclusion complexes obtained by:
a – fluid-bed complexation; b – co-precipitation; c – paste complexation, d) dry mixing

Due to that, inclusion complexes obtained via these approaches can be used in the production of tablet dosage forms of gramicidin S applying direct compression technology, which is the most suitable for tablet production for buccal application [11]. The transition to this type of technology will significantly reduce costs by simplifying the technology and reducing the production time.

Moreover, use of β -cyclodextrin makes it possible to abandon such fillers as lactose or sucrose that will reduce the risk of using the drug for patients with individual intolerance to these components. Also formation of agglomerates containing inclusion complexes of gramicidin S and β -cyclodextrin can reduce the risk of incom-

patibility of the finished drug with the indicator "Uniformity of dosage", which is critical for low-dosage drug formulations [12].

CONCLUSION

Within this work we revealed the influence of methods for obtaining gramicidin S and β -cyclodextrin inclusion complexes on the technological parameters of the final product. We determined that using various approaches allows to obtain inclusion complexes identical in chemical structure, while the complexation proceeds at the L-ornithine amino group in the gramicidin S molecule.

At the same time, we found significant differences in the particle morphology of the inclusion complexes obtained using various approaches, which explains the significant variability of technological parameters of the resulting products, such as flowability, slope angle, bulk density.

Applying the obtained results for the development of new buccal dosage forms of gramicidin S will decrease the risk of inconsistency of the uniformity of dosage indicator, allowing also excluding the use of lactose and sucrose as fillers.

REFERENCES

1. Pavithra G., Rajasekaran R. Gramicidin peptide to combat antibiotic resistance: a review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2020;26(1):191–199. DOI: 10.1007/s10989-019-09828-0.
2. Wenzel M., Rautenbach M., Vosloo J. A., Siersma T., Aisenbrey C. H., Zaitseva E., Laubscher W. E., van Rensburg W., Behrends J. C., Bechinger B., Hamoen L. W. The multifaceted antibacterial mechanisms of the pioneering peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin S. *mBio*. 2018;9(5). DOI: 10.1128/mBio.00802-18.
3. Mahours G. M., Shaaban D. E. Z., Shazly G. A., Auda S. H. The effect of binder concentration and dry mixing time on granules, tablet characteristics and content uniformity of low dose drug in high shear wet granulation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2017;39,192–199. DOI: 10.1016/j.jddst.2017.03.014.
4. Del Valle E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. 2004;39(9):1033–1046. DOI: 10.1016/s0032-9592(03)00258-9.
5. Conceição J., Adeoye O., Cabral-Marques H. M., Lobo J. M. S. Cyclodextrins as excipients in tablet formulations. *Drug Discovery Today*. 2018;23(6):1274–1284. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.04.009.
6. Prabu S., Samad N. A., Ahmad N. A., Jumbri K., Raoov M., Rahim N. Y., Samikannu K., Mohamad S. Studies on the supramolecular complex of a guanosine with beta-cyclodextrin and evaluation of its anti-proliferative activity. *Carbohydrate research*. 2020;497:108–138. DOI: 10.1016/j.carres.2020.108138.
7. Alshaer W., Zraikat M., Amer A., Nsairat H., Lafi Z., Alqudah D. A., Qadi E. A., Alsheleh T., Odeh F., Alkaraki A., Zihlif M., Bustanji Y., Fattal E., Awidi A. Encapsulation of echinomycin in cyclodextrin inclusion complexes into liposomes: in vitro anti-proliferative and anti-invasive activity in glioblastoma. *RSC Advances*. 2019; 9(53):30976–30988. DOI: 10.1039/c9ra05636j.
8. Conceição J., Adeoye O., Cabral-Marques H., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C., Lobo J. M. S. Orodispersible carbamazepine/hydroxypropyl-β-cyclodextrin tablets obtained by direct compression with five-in-one co-processed excipients. *AAPS PharmSciTech*. 2020;21(2):1–10. DOI: 10.1208/s12249-019-1579-5.
9. Demchenko D. V., Dzhayn E. A., Balaban'yan V. Yu., Makarova M. N., Makarov V. G. Development and biopharmaceutical evaluation of tablets based on the sparingly soluble substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil. *Drug development and registration*. 2020;9(4):79–87. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-79-87.
10. Švonja-Parezanović G., Lalić-Popović M., Goločorbin-Kon S., Todorović N., Pavlović N., Jovičić-Bata J. The effect of magnesium stearate and sodium starch glycolate on powder flowability. *Acta Periodica Technologica*. 2019;50:304–310. DOI: 10.2298/APT1950304S.
11. Nachajski M. J., Bazela A., Zarzycka M., Broszczyk A., Kolba A., Kolodziejczyk M. K. Effect of API on Powder Flowability, Direct Compression and Properties of Orally Disintegrating Tablets: A Preformulation Study. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;81(3):489–495. DOI: 10.36468/pharmaceutical-sciences.534.
12. Sun W. J., Aburub A., Sun C. C. Particle Engineering for Enabling a Formulation Platform Suitable for Manufacturing Low-Dose Tablets by Direct Compression. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;106(7):1772–1777. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.03.005.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-109-117>
УДК 615.012



Оригинальная статья / Research article

Разработка таблеток 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия, покрытых кишечнорастворимой оболочкой

Ю. М. Коцур✉, Е. В. Флисюк, И. А. Наркевич

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: Коцур Юлия Михайловна. E-mail: uliya.kocur@spcru.ru

ORCID: Ю. М. Коцур – <http://orcid.org/0000-0001-9292-4240>; Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Статья поступила: 09.03.2022

Статья принята в печать: 12.05.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Кишечнорастворимые покрытия обладают широким спектром функций: от защиты АФИ от неблагоприятного воздействия кислой среды желудка до направленной доставки в определенные отделы кишечника с целью увеличения эффективности ЛП. При разработке таких ЛФ особое внимание уделяют типу пленкообразующего полимера в составе покрытия, его растворимости и способности выдерживать прохождение через желудок.

Цель. Разработка таблеток на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия, покрытых кишечнорастворимой оболочкой.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись таблетки-ядра 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия 60 мг и композиции для кишечнорастворимых покрытий. Равномерность распределения покрытий по таблеткам определяли по методике, разработанной на кафедре технологии ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России, на основании уравнения Фоккера – Планка. Кинетику растворения таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой, изучали с использованием тестера растворения таблеток ERWEKA DT 626 (ERWEKA GmbH, Германия). Количество перешедшего в среду растворения вещества определяли при помощи спектрофотометра СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия).

Результаты и обсуждение. Установлено, что все исследуемые покрытия распределяются по таблеткам равномерно. При изучении кинетики растворения таблеток установлено, что все покрытия обладают устойчивостью к воздействию кислой среды (0,1 М раствор хлористоводородной кислоты), однако в фосфатном буферном растворе наиболее высокая скорость высвобождения вещества из таблеток достигается с применением покрытия на основе сополимера метакриловой кислоты и этилакрилата типа В.

Заключение. Разработаны таблетки на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия, покрытые кишечнорастворимой оболочкой AquaPolish® P white 712.06E.

Ключевые слова: кишечнорастворимое покрытие, пленочная оболочка, 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия, кинетика высвобождения, биофармацевтическая растворимость

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

Вклад авторов. Ю. М. Коцур и Е. В. Флисюк спланировали эксперимент. Ю. М. Коцур проводила запланированные исследования. Все авторы участвовали в обработке данных, обсуждении результатов и написании статьи.

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

Для цитирования: Коцур Ю. М., Флисюк Е. В., Наркевич И. А. Разработка таблеток 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия, покрытых кишечнорастворимой оболочкой. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):109–117. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-109-117>

Development of Enteric-coated Tablets of Sodium 4,4'-(propnadiamido)dibenzoate

Julia M. Kotsur✉, Elena V. Flisyuk, Igor A. Narceevich

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

✉ Corresponding author: Julia M. Kotsur. E-mail: uliya.kocur@spcru.ru

ORCID: Julia M. Kotsur – <http://orcid.org/0000-0001-9292-4240>; Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; Igor A. Narceevich – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Received: 09.03.2022

Revised: 12.05.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. Enteric coat have a wide range of functions: from protecting the API from the adverse effects of the acidic environment of the stomach to targeted delivery to certain parts of the intestine in order to increase the effectiveness of the drug. When developing such dosage forms, special attention is paid to the type of film-forming polymer in the coating composition, its solubility and ability to withstand passage through the stomach.

Aim. Development of enteric-coated tablets based on sodium 4,4'-(prpoandiamido)dibenzoate.

© Коцур Ю. М., Флисюк Е. В., Наркевич И. А., 2022

© Kotsur Ju. M., Flisyuk E. V., Narceevich I. A., 2022

Materials and methods. The objects of the study were sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate 60 mg core tablets and compositions for enteric coatings. The uniformity of distribution of coatings over tablets was determined by the method developed at the Department of Technology of Medicinal Forms of SPCPU on the basis of the Fokker–Planck equation. The dissolution kinetics of enteric-coated tablets was studied using an ERWEKA DT 626 tablet dissolution tester (ERWEKA GmbH, Germany). The amount of the substance that passed into the dissolution medium was determined using an SF-2000 spectrophotometer (LLC "OKB Spektr", Russia).

Results and discussion. It has been established that all the studied coatings are evenly distributed over the tablets. When studying the kinetics of tablet dissolution, it was found that all coatings are resistant to acidic environments (0.1 M hydrochloric acid solution), however, in a phosphate buffer solution, the highest rate of release of the substance from tablets is achieved using a coating based on a copolymer of methacrylic acid and ethyl acrylate of the type B.

Conclusion. Tablets based on sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate, enteric-coated AquaPolish® P white 712.06E were developed.

Keywords: enteric coating, film coating, sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate, release kinetics, biopharmaceutical solubility

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. Julia M. Kotsur and Elena V. Flisyuk developed an experiment. Julia M. Kotsur conducted the planned studies. All authors participated in data processing, text writing and discussion of the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within 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: Kotsur Ju. M., Flisyuk E. V., Narceyevich I. A. Development of enteric-coated tablets of sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate. *Drug development & registration*. 2022;11(2):109–117. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-109-117>

ВВЕДЕНИЕ

Кишечнорастворимые покрытия обладают широким спектром функций: от защиты активного фармацевтического ингредиента (АФИ) от неблагоприятного воздействия кислой среды желудка [1–3] до направленной доставки в определенные отделы кишечника с целью увеличения эффективности лекарственного препарата (ЛП) [4–6].

4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия, обладающий антистеатозным действием, обладает высокой биофармацевтической растворимостью в среде с pH 6,8 [7, 8], в связи с чем его доставка в тонкий отдел кишечника представляет интерес для фармацевтической разработки.

При разработке таких лекарственных форм (ЛФ) особое внимание уделяют типу пленкообразующего полимера в составе покрытия, его растворимости и способности выдерживать прохождение через желудок.

Перспективными и широко распространенными полимерами для создания кишечнорастворимых покрытий являются различные сополимеры метакриловой кислоты и этилакрилата, производные гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ) и др. [2, 9–11]. Преимуществом таких полимеров является возможность их диспергирования в воде с добавлением стабилизаторов гетерогенную систему ПАВ: триэтилцитрата (ТЭЦ), пропиленгликоля (ПГ) и др.

Целью настоящего исследования являлась разработка таблеток на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия, покрытых кишечнорастворимой оболочкой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Объектами исследования являлись таблетки-ядра 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия, а также композиции для кишечнорастворимых покрытий.

АФИ 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия представляет собой оригинальную субстанцию, синтезированную на кафедре ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России. В работе была использована серия субстанции 010321. В состав таблеток-ядер были включены вспомогательные вещества (ВВ): лактозы моногидрат (DFE Pharma, Германия), крахмал (Roquette, Франция), натрия кроскармеллоза (Mingtai Chemical Co., Ltd., Тайвань), поливинилпирролидон К-29/32 (BASF, Германия), твин-80 (BASF, Германия), магния стеарат фармакопейный (ООО «ТПК «Леко Стайл», Россия). Количественное содержание АФИ в одной таблетке – 60 мг.

В работе были использованы композиции для кишечнорастворимых покрытий компании Bioground GmbH (Германия), растворимые в щелочных средах с различными значениями pH:

- AquaPolish® P white 010.223E.
- AquaPolish® P white 010.222E.
- AquaPolish® P white 010.201E.

В качестве пленкообразующего полимера в данных составах использована гидроксипропилметилцеллюлоза ацетат-сукцинат (ГПМЦ-АС) с различным числом заместителей для растворения в разных значениях pH.

Альтернативной являлась композиция AquaPolish® P white 712.06E. Пленкообразователем в данной

композиции выступает сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата типа В.

В качестве стабилизатора при приготовлении пленкообразующих суспензий во всех случаях был использован ТЭЦ (Bioground GmbH, Германия).

При приготовлении сред растворения для изучения кинетики высвобождения АФИ из таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой, были использованы реактивы:

- Вода очищенная.
- Кислота хлористоводородная, ос.ч. (АО «ВЕКТОН», Россия).
- Кислота лимонная, ИМП (АО «ВЕКТОН», Россия).
- Динатрия гидрофосфат. С. А0391772, Cat № 44814 (Acros Organics, США).

На момент проведения исследования все материалы и реактивы обладали не истекшим сроком годности.

Методы

Таблетки 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия получали в соответствии с технологией, разработанной в рамках Государственного контракта от 28.04.2017 г. № 14.N08.11.0131 на тему «Доклинические исследования лекарственного средства на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия, обладающего антистеатозным действием». Для прессования таблеток массой 0,300 г и диаметром 9 мм использовали однопуансонный таблеточный пресс ERWEKA EP-1 (ERWEKA GmbH, Германия). Таблетки анализировали по показателям: прочность на раздавливание и истираемость в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV изд.¹ Для определения прочности таблеток на раздавливание использовали тестер твердости таблеток ERWEKA TBH 125 TDP (ERWEKA GmbH, Германия). Определение истираемости таблеток проводили в барабане с 12 лопастями в тестере ERWEKA TAR 220 (ERWEKA GmbH, Германия).

Для проведения исследования готовили суспензии из композиций в следующих концентрациях:

- AquaPolish® P white 010.223E; AquaPolish® P white 010.222E; AquaPolish® P white 010.201E – 13,2 %;
- AquaPolish® P white 712.06E – 20,0 %.

Указанные концентрации были выбраны в соответствии с рекомендациями производителя.

Рассчитанное количество воды очищенной помещали в емкость с установленной верхнеприводной мешалкой, в воду добавляли рассчитанное количество ТЭЦ и перемешивали со скоростью вращения мешалки 200 об/мин. При включенной мешалке в образующуюся воронку небольшими порциями вносили пленкообразующую композицию в соответствии с составом и перемешивали в течение 40–50 мин до образования однородной суспензии. Полученную

суспензию фильтровали через сито с размером отверстий 0,1 мм для предотвращения забивания сопла форсунки.

Покрытие таблеток-ядер оболочками осуществляли на лабораторной установке для нанесения покрытий барабанного типа BGB-1 (Chongqing Jinggong Pharmaceutical Machinery Co., Ltd., Китай).

Исходя из конструктивных особенностей использованной в работе лабораторной установки для нанесения покрытий, а также в связи с отсутствием термолабильных веществ в составах таблеток и пленкообразующих суспензий, были выбраны следующие постоянные технологические параметры:

- частота работы вентилятора на подачу воздуха – 40 Гц;
 - частота работы вентилятора на отведение воздуха – 45 Гц;
 - температура входящего воздуха – 75 °С;
 - температура выходящего воздуха – 35 °С;
 - скорость подачи пленкообразующей суспензии – 10 мл/мин;
 - давление сжатого воздуха на распыл – 1,0 мбар.
- Наносили оболочку до достижения массовой доли:
- 6, 8, 10 % для покрытий на основе ГПМЦ-АС;
 - 12, 16, 20 % для покрытия на основе сополимера метакриловой кислоты и этилакрилата типа В.

При покрытии таблеток оболочками определяли равномерность распределения покрытия по таблеткам по методике, разработанной на кафедре технологии лекарственных форм ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, на основе уравнения Фоккера – Планка, путем оценки нормальности распределения значения массы покрытия и массы таблеток, покрытых пленочной оболочкой. Уравнение Фоккера – Планка для аппарата периодического действия идеального смешения имеет вид:

$$\frac{\partial}{\partial t} \varphi(z, t; x, t) + \frac{\partial}{\partial z} u(z, t; x, t_0) = \frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial z^2} b(z, t) \varphi(z, t; x, t_0), \quad (1)$$

где x – масса исходной таблетки; z – масса покрытой таблетки; $t - t_0$ – время процесса; $\varphi(z, t; x, t_0)$ – плотность вероятности перехода системы (монодисперсных частиц) из состояния x в состояние z за время $t - t_0 = \tau > 0$;

$u(z, t)$ – массовая скорость роста таблеток; $\frac{1}{2} b(z, t)$ – коэффициент диффузии в пространстве масс.

Для этого перед началом опыта отбирали пробу таблеток (150 шт) и отмечали их. Проба в 150 таблеток выбиралась из соображений ее большей представительности, что соответствует доверительной оценке с надежностью 0,95. Отобранные таблетки предварительно высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре $(102,5 \pm 2,5)$ °С в течение 2 часов и измеряли массу таблеток. Проводили нанесение пленочного покрытия в количестве 8 % от массы покрытой таблетки для всех составов. После нанесения оболочки помеченные таблетки отбирали из слоя и вновь высушивали и измеряли массу.

¹ Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издания. Т. 2. Режим доступа на: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Ссылка активна на 28.04.2022.

После измерения 150 таблеток были рассчитаны: средняя масса (M), среднее квадратичное отклонение, медиана (Me), мода (Mo) и асимметрия (AS) функций распределения. Расчет данных параметров проводился с использованием встроенных функций программы Microsoft Excel. Оценку равномерности определяли по критериям нормального распределения:

- $M = Me = Mo$.
- $AS < 0,5$.

В том случае, если полученные данные соответствовали представленным критериям, считали функцию распределения массы таблеток нормальной и определяли нанесение пленочного покрытия по таблеткам как равномерное.

После нанесения оболочек проводили выбор композиции и необходимую массовую долю покрытия для доставки в кишечник по изучению кинетики растворения таблеток в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV изд., ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм»¹. Растворение проводили в две стадии: первая – кислотная стадия, вторая – щелочная в фосфатном буферном растворе pH 6,8.

Для изучения кинетики растворения использовали тестер растворения ERWEKA DT 626 (ERWEKA GmbH, Германия). Применяли прибор I «Вращающаяся корзинка» со скоростью вращения 100 об/мин. В качестве сред растворения использовали: 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной в течение первых двух часов, фосфатный буферный раствор с pH 6,8 – в течение следующего часа. Объем среды растворения составлял 1000 мл при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

Приготовление 1 М раствора хлористоводородной кислоты: 87,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной доводили водой до объема 1000,0 мл (1 М раствор).

Приготовление 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты: 100,0 мл полученного 1 М раствора хлористоводородной кислоты доводили водой до объема 1000,0 мл. При необходимости доводят pH до 1,2.

Приготовление фосфатного буферного раствора pH 6,8: 77,3 мл 71,5 г/л раствора динатрия гидрофосфата смешивали с 22,7 мл 21 г/л раствора лимонной кислоты.

Каждый из 6 сосудов наполняли соответствующей средой растворения. 6 таблеток по одной помещали в каждый аппарат «Вращающаяся корзинка» и проводили испытание. По прошествии кислотной стадии отбирали пробу раствора (точка «0»), а затем производили полную замену среды растворения. Отбирали пробы по 10 мл по истечении 15, 30, 45, 60 мин с момента замены растворителя с восполнением среды растворения. Отобранную пробу фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Из отобранных проб брали аликвоту 5 мл и помещали в

мерную колбу на 50 мл, объем раствора доводили до метки водой очищенной.

Количество вещества, перешедшего в среду растворения, определяли методом УФ-спектрофотометрии при длине волны 268 ± 2 нм в кювете кварцевого стекла с толщиной поглощающего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

В качестве раствора стандартного образца (PCO) использовали раствор субстанции 4,4'-(пропандиамидо)дибензоат натрия (СПХФУ, Россия) с содержанием основного вещества не менее 99,7 %.

Количество высвободившегося вещества (X , %) рассчитывали по формуле (2):

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot V \cdot N \cdot 100}{A_0 \cdot L}, \quad (2)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность стандартного раствора; a_0 – навеска вещества в стандартном растворе, г; N – коэффициент, учитывающий разведение; V – объем среды растворения, мл; P – содержание основного вещества в АФИ, использованном для приготовления стандартного раствора, %; L – заявленное содержание вещества в таблетке, г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были получены таблетки 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия с дозировкой 60 мг, которые соответствовали фармакопейным требованиям по показателям: прочность на раздавливание и истираемость. Таблетки обладали удовлетворительным внешним видом: на поверхности не наблюдалось расслаивания смеси, сколов, трещин и других дефектов.

Результаты определения однородности распределения покрытия по таблеткам представлены в таблице 1 и на рисунках 1–4.

Анализ полученных данных показал, по всей функции плотности распределения масс таблеток после покрытия оболочками соответствовали нормальному распределению. Однако после покрытия оболочкой AquaPolish® P white 010.201E плотность распределения масс сужается, что, вероятно, может быть связано с тем, что оболочка было нанесено больше запланированного количества на 1,5 %. Аналогичный эффект наблюдается также после покрытия таблеток оболочкой AquaPolish® P white 010.223E.

Результаты изучения кинетики растворения в щелочной среде представлены на рисунках 5–8.

Анализ полученных данных показал, что все исследуемые покрытия выдерживают растворение в кислой среде и обеспечивают доставку ДВ в кишечник. Данное свойство характерно для покрытий подобных составов и при более низкой массовой доле оболочек [2, 9].

Кишечнорастворимые покрытия на основе ГПМЦ-АС показывают низкую скорость высвобождения вещества из таблеток. Известны случаи, когда покрытия на основе ГПМЦ-АС с добавлением нераство-

¹ Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издания. Т. 2. Режим доступа на: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Ссылка активна на 28.04.2022.

Таблица 1. Результаты определения показателей нормального распределения для таблеток, покрытых кишечнорастворимыми оболочками

Table 1. The results of the determination of indicators of normal distribution for enteric-coated tablets

	AquaPolish® P white 010.223E	AquaPolish® P white 010.222E	AquaPolish® P white 010.201E	AquaPolish® P white 712.06E
Средняя масса таблеток-ядер, г Average weight of core tablets, g	0,298	0,295	0,293	0,292
Средняя масса таблеток после покрытия оболочкой, г Average weight of tablets after coating, g	0,327	0,323	0,325	0,319
Массовая доля оболочки, % Mass fraction of the shell, %	8,87	8,67	9,85	8,46
Среднее квадратичное отклонение (σ) Standard deviation (σ)	0,0047	0,0072	0,0046	0,0080
Медиана (ME) Median (ME)	0,327	0,323	0,325	0,320
Мода (МО) Mode (МО)	0,328	0,323	0,324	0,320
Асимметрия (AS) Asymmetry (AS)	-0,43 (<0,5)	-1,12 (<0,5)	-0,33 (<0,5)	-0,34 (<0,5)

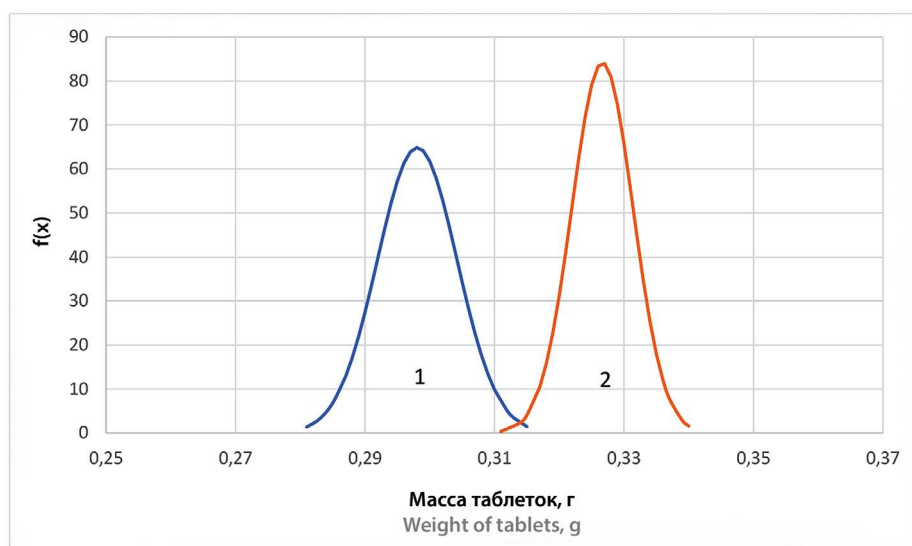


Рисунок 1. Кривые функции плотности распределения масс таблеток до (1) и после (2) покрытия оболочкой AquaPolish® P white 010.223E

Figure 1. Weight distribution function curves of tablets before (1) and after (2) coating with AquaPolish® P white 010.223E

римых полимеров применялись для создания ЛФ с пролонгированным высвобождением [10]. Однако таблетки, покрытые AquaPolish® P white 010.222E, в сравнении с другими покрытиями данного исследования на основе ГПМЦ-АС показывает значительно более высокую скорость высвобождения АФИ, данный эффект, вероятно, может быть связан с меньшим количеством заместителей в полимерной цепи.

Наибольшую скорость высвобождения вещества в среду с pH 6,8 показывают покрытия AquaPolish® P white 712.06E. При нанесении последнего в количестве 12 % высвобождение ДВ из таблетки достигает 100 % через 45 мин от замены среды растворения. Таким образом, с использованием данного покрытия может быть достигнута максимальная эф-

фективность препарата при трехкратном пероральном применении в течение дня таблеток с дозировкой 60 мг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой на основе 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия. AquaPolish® P white 712.06E (концентрация в суспензии 20 %) на основании полученных данных выбрано в качестве композиции для покрытия. Данное покрытие позволяет высвобождать до 100 % АФИ через 45 мин в фосфатном буферном растворе pH 6,8, что может обеспечить высокую эффективность полученного препарата.

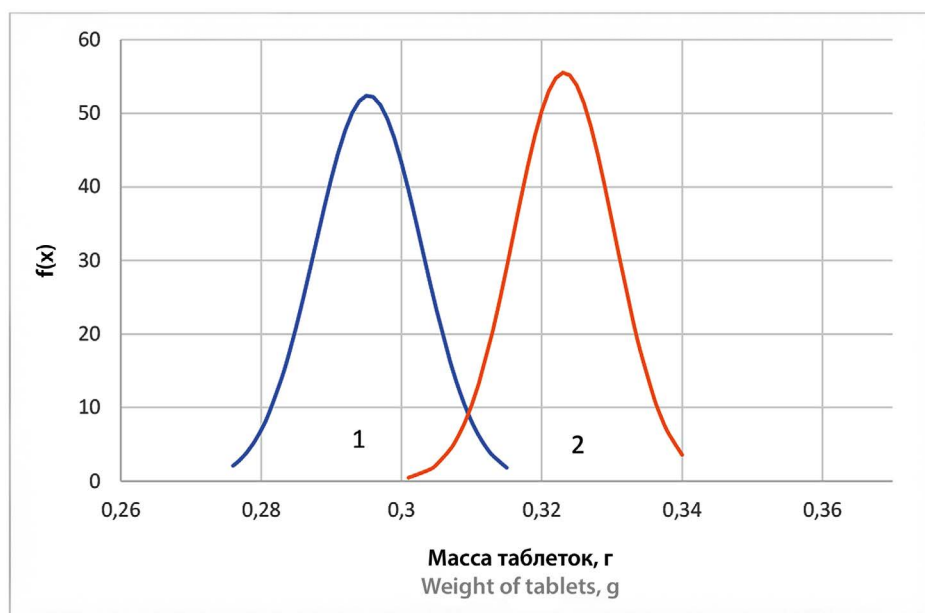


Рисунок 2. Кривые функции плотности распределения масс таблеток до (1) и после (2) покрытия оболочкой AquaPolish® P white 010.222E

Figure 2. Weight distribution function curves of tablets before (1) and after (2) coating with AquaPolish® P white 010.222E

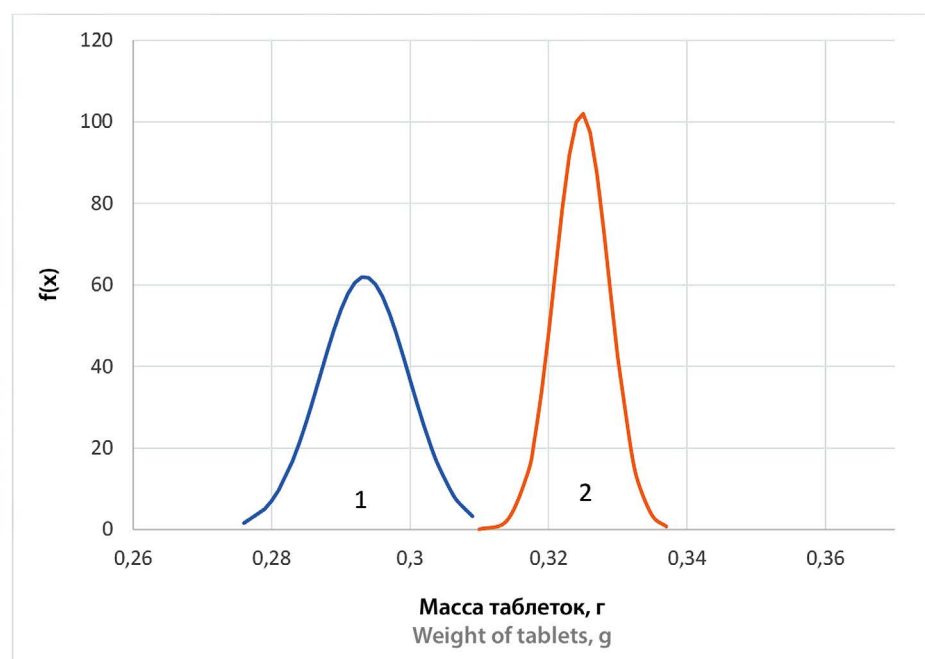


Рисунок 3. Кривые функции плотности распределения масс таблеток до (1) и после (2) покрытия оболочкой AquaPolish® P white 010.201E

Figure 3. Weight distribution function curves of tablets before (1) and after (2) coating with AquaPolish® P white 010.201E

ЛИТЕРАТУРА

1. Мазова Н.В., Марченко А.Л., Смехова И.Е. Разработка состава и технологии получения гранул омепразола в аппарате псевдоожиженного слоя. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):74–79. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-74-79.
2. Mohapatra S. K., Sahoo R. N., Mallick S., Mohapatra R. Enteric Dis-solution Enhancement of Engineered Gastro Resistant Omepra-zole Tablets using Hydroxypropyl Methylcellulose Acetate Suc-cinate. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2021;55(3):677-684. DOI: 10.5530/ijper.55.3.139.
3. Zhang X., Cheng Y., Li X., Tan X., Shi L., Shi X., Xie C., Li J. Efficacy and safety of the Chinese herbal formula Hewei Jiangni recipe

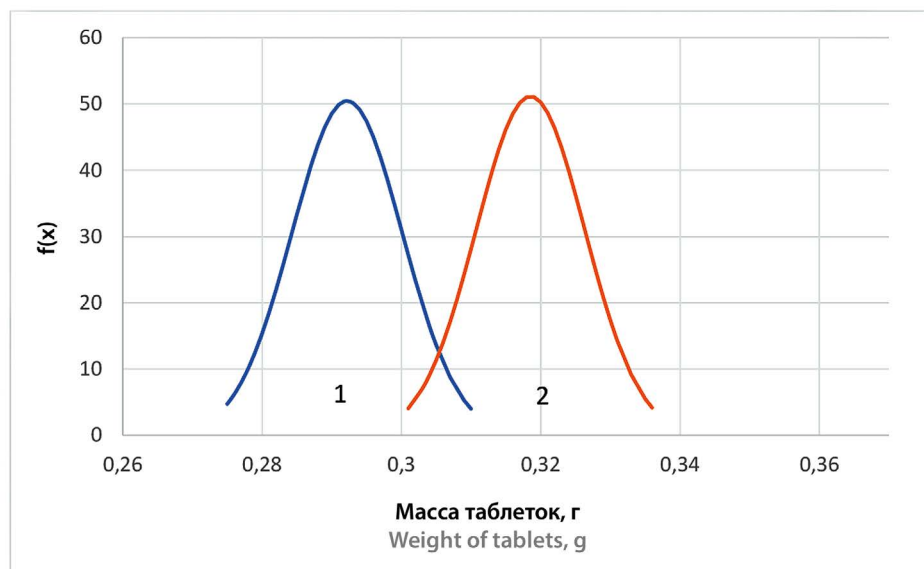


Рисунок 4. Кривые функции плотности распределения масс таблеток до (1) и после (2) покрытия оболочкой AquaPolish® P white 712.06E

Figure 4. Weight distribution function curves of tablets before (1) and after (2) coating with AquaPolish® P white 712.06E

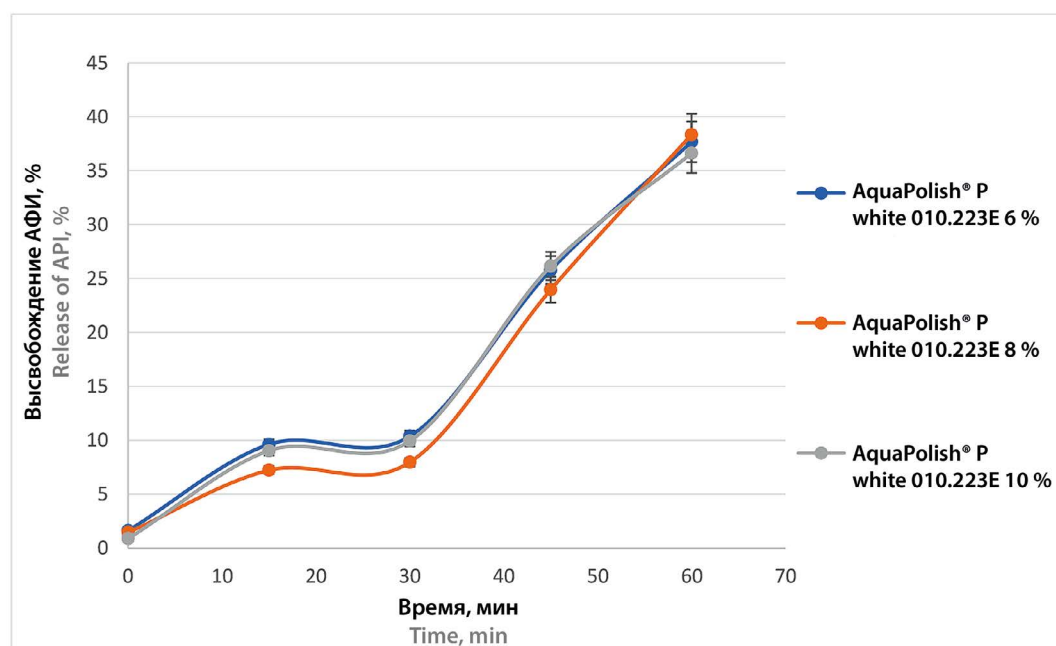


Рисунок 5. Кривая кинетики высвобождения АФИ из таблеток, покрытых оболочкой AquaPolish® P white 010.223E

Figure 5. API release kinetic curve from AquaPolish® P white 010.223E coated tablets

- for NERD with cold-heat complex syndrome: study protocol for a double-blinded randomized controlled trial. *Trials*. 2021;22(1):545. DOI: 10.1186/s13063-021-05471-7.
4. Moutaharrik S., Maroni A., Melocchi A., Zema L., Foppoli A., Cerea M., Palugan L., Neut C., Siepmann F., Siepmann J., Gazzaniga A. Oral colon delivery platform based on a novel combination approach: Design concept and preliminary evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021;66:102919. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102919.
5. Nandhakumar S., Sugreevudu G., Hari Krishnan N. Formulation design and Evaluation of Extended-Release Tablets of Oxybutynin for Effective Management of Overactive Bladder Syndrome. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2021;14(12):6558–6564. DOI: 10.52711/0974-360X.2021.01135.
6. Khannal D., Chang R. Y. K., Hick C., Morales S., Chan H.-K. Enteric-coated bacteriophage tablets for oral administration against gastrointestinal infections. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;609:121206. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.121206.

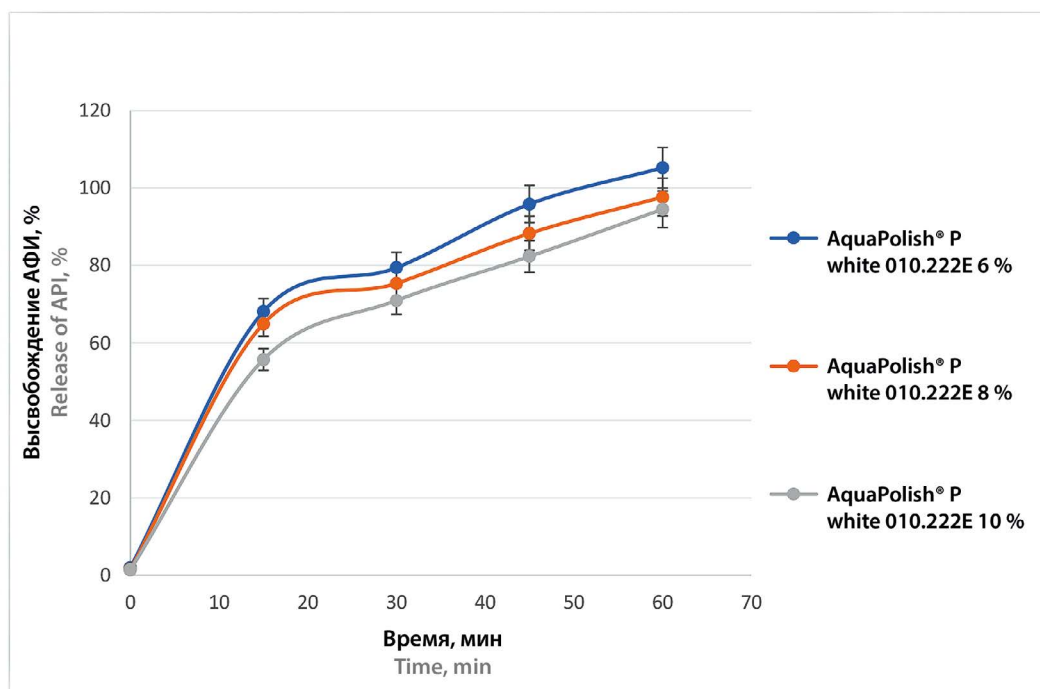


Рисунок 6. Кривая кинетики высвобождения АФИ из таблеток, покрытых оболочкой AquaPolish® P white 010.222E

Figure 6. API release kinetic curve from AquaPolish® P white 010.222E coated tablets

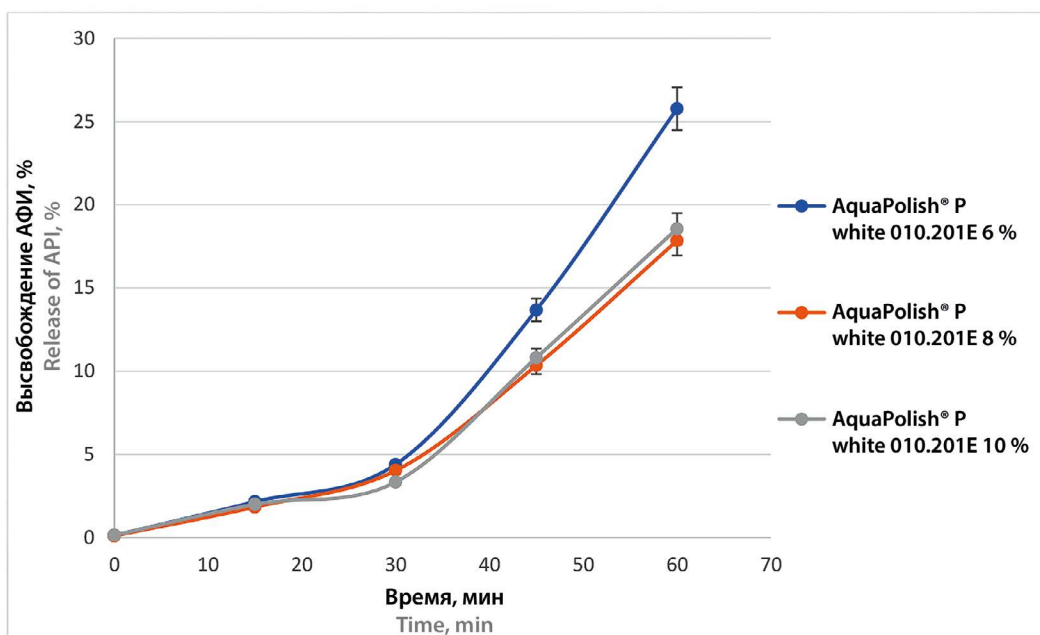


Рисунок 7. Кривая кинетики высвобождения АФИ из таблеток, покрытых оболочкой AquaPolish® P white 010.201E

Figure 7. API release kinetic curve from AquaPolish® P white 010.201E coated tablets

- Коцур Ю. М., Ладутко Ю. М., Наркевич И. А., Флисюк Е. В. Прогнозирование состава таблеток с пролонгированным высвобождением на основе 4,4'-(пропандиамидо)дипбензоата натрия с применением метода SeDeM. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):54–62. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-54-62.
- Флисюк Е. В., Коцур Ю. М., Наркевич И. А., Смехова И. Е., Ивкин Д. Ю. Разработка методики проведения теста «Растворение» для таблеток 4,4'-(пропандиамидо)дипбензоата натрия с пролонгированным высвобождением. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):146–154. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-146-154.

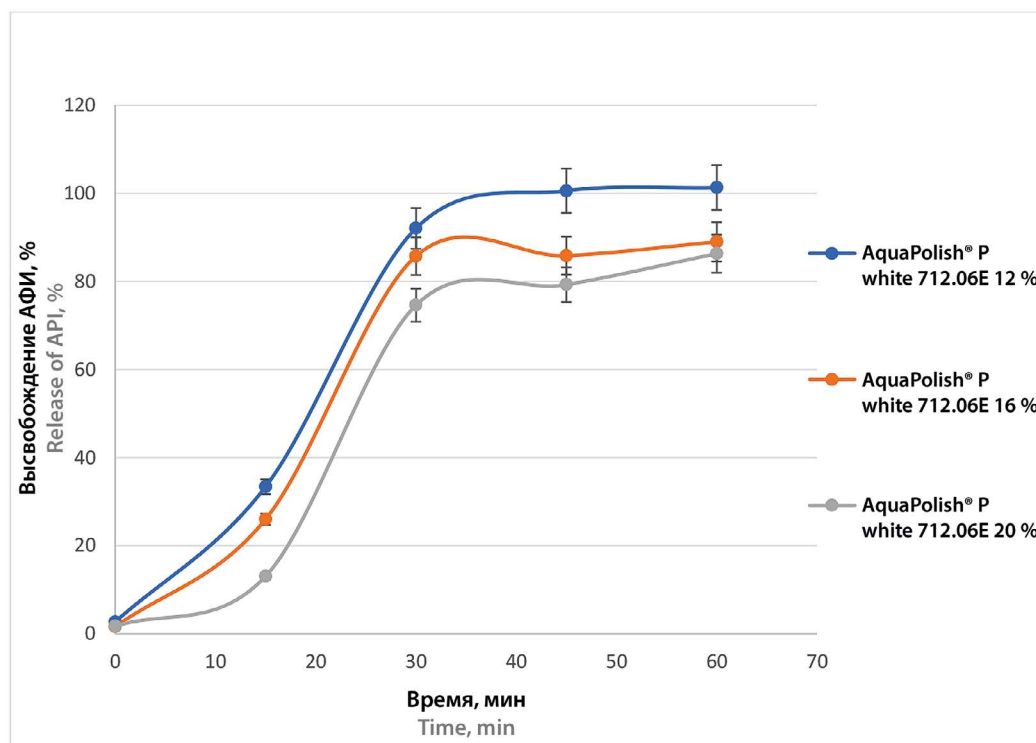


Рисунок 8. Кривая кинетики высвобождения АФИ из таблеток, покрытых оболочкой AquaPolish® P white 712.06E

Figure 8. API release kinetic curve from AquaPolish® P white 712.06E coated tablets

- Katona M. T., Kakuk M., Szabo R., Tonka-Nagy P., Takacs-Novak K., Borbas E. Towards a Better Understanding of the Post-Gastric Behavior of Enteric-Coated Formulations. *Pharmaceutical Research*. 2022;39(1):201–211. DOI: 10.1007/s11095-021-03163-0.
- Yang Q., Yuan F., Chen J., Zhou H., Yang G., Zhu J. Delayed sustained drug release from electrostatic powder coated tablets with ultrafine polymer blend. *Powder Technology*. 2021;394:496–503. DOI: 10.1016/j.powtec.2021.08.088.
- Trinada Rao M., Parimala Y., Yamini M., Phanindra C., Srinivasa Rao Y. Formulation and in vitro evaluation of ramelteon tablets for colon drug delivery system by compression coating. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(2):249–253. DOI: 10.22159/ijap.2021v13i2.40396.

REFERENCES

- Mazova N. V., Marchenko A. L., Smehova I. E. Research and Development of the Composition and Technology Receiving of Granules of Omeprazol in the Fluid Bed Apparatus. *Drug development & registration*. 2019;8(2):74–79. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-74-79.
- Mohapatra S. K., Sahoo R. N., Mallick S., Mohapatra R. Enteric Dissolution Enhancement of Engineered Gastro Resistant Omeprazole Tablets using Hydroxypropyl Methylcellulose Acetate Succinate. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2021;55(3):677–684. DOI: 10.5530/ijper.55.3.139.
- Zhang X., Cheng Y., Li X., Tan X., Shi L., Shi X., Xie C., Li J. Efficacy and safety of the Chinese herbal formula Hewei Jiangni recipe for NERD with cold-heat complex syndrome: study protocol for a double-blinded randomized controlled trial. *Trials*. 2021;22(1):545. DOI: 10.1186/s13063-021-05471-7.
- Moutaharrik S., Maroni A., Melocchi A., Zema L., Foppoli A., Cerea M., Palugan L., Neut C., Siepmann F., Siepmann J., Gazzaniga A. Oral colon delivery platform based on a novel combination approach: Design concept and preliminary evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021;66:102919. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102919.
- Nandhakumar S., Sugreevudu G., Hari Krishnan N. Formulation design and Evaluation of Extended-Release Tablets of Oxybutynin for Effective Management of Overactive Bladder Syndrome. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2021;14(12):6558–6564. DOI: 10.52711/0974-360X.2021.01135.
- Khannal D., Chang R. Y. K., Hick C., Morales S., Chan H.-K. Enteric-coated bacterioophage tablets for oral administration against gastrointestinal infections. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;609:121206. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.121206.
- Kotsur J. M., Ladytko J. M., Narkevich I. A., Flisyuk E. V. Prediction of the composition of prolonged release tablets based on 4,4'-(propanediamido) sodium dibenzoate using the SeDeM method. *Drug development & registration*. 2021;10(4):54–62. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-54-62.
- Flisyuk E. V., Kotsur J. M., Narkevich I. A., Smekhova I. E., Ivkin D. Yu. Development of the "Dissolution" Test Method for Tablets of Sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate with Sustained Release. *Drug development & registration*. 2021;10(4):146–154. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-146-154.
- Katona M. T., Kakuk M., Szabo R., Tonka-Nagy P., Takacs-Novak K., Borbas E. Towards a Better Understanding of the Post-Gastric Behavior of Enteric-Coated Formulations. *Pharmaceutical Research*. 2022;39(1):201–211. DOI: 10.1007/s11095-021-03163-0.
- Yang Q., Yuan F., Chen J., Zhou H., Yang G., Zhu J. Delayed sustained drug release from electrostatic powder coated tablets with ultrafine polymer blend. *Powder Technology*. 2021;394:496–503. DOI: 10.1016/j.powtec.2021.08.088.
- Trinada Rao M., Parimala Y., Yamini M., Phanindra C., Srinivasa Rao Y. Formulation and in vitro evaluation of ramelteon tablets for colon drug delivery system by compression coating. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(2):249–253. DOI: 10.22159/ijap.2021v13i2.40396.

Оригинальная статья / Research article

Разработка состава и технологии комбинированного лекарственного средства на основе микросфер с доксорубицина гидрохлоридом и коеновой кислоты

Т. А. Биткина^{1,2}✉, А. В. Басевич¹

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

² ООО «Фарма Ген», 194064, Россия, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4, лит. А

✉ Контактное лицо: Биткина Татьяна Александровна. E-mail: tatiana.bitkina@pharminnotech.com

ORCID: Т. А. Биткина – <http://orcid.org/0000-0002-6253-0213>; А. В. Басевич – <http://orcid.org/0000-0002-6864-6794>.

Статья поступила: 09.03.2022

Статья принята в печать: 16.05.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. В последние десятилетия в лечении онкологии прогрессирует роль рентгенэндоваскулярных методов. Стало возможным выполнять эмболизацию не только для остановки кровотечения из опухоли, но и с целью адресной доставки химиопрепаратов. Однако особый интерес представляет разработка новых комбинированных препаратов, сочетающих цитостатическое действие, эмболизацию кровеносных сосудов, питающих опухоль, и обезболивание.

Цель. Цель исследования – разработка состава и технологии комбинированного лекарственного средства для парентерального введения, включающего лиофилизированные полимерные микросферы, насыщенные доксорубицина гидрохлоридом, и инъекционный раствор коеновой кислоты.

Материалы и методы. Исследование сорбции коеновой кислоты полимерными микросферами осуществляли с использованием метода ВЭЖХ. Анализ внешнего вида полимерных микросфер и получение их фотографических изображений проводили методом микроскопии при помощи микроскопа с цифровой камерой.

Результаты и обсуждение. Проведенное исследование позволило определить, что коеновая кислота, в отличие от доксорубицина гидрохлорида, практически не сорбируется полимерными микросферами, что обосновывает целесообразность включения раствора коеновой кислоты в состав готовой лекарственной формы в виде отдельного инъекционного раствора. Установлено, что при получении лиофилизированных полимерных микросфер, насыщенных доксорубицина гидрохлоридом, необходимо использовать в качестве растворителя лиофилизата доксорубицина гидрохлорида воду для инъекций. Разработано комбинированное лекарственное средство, предназначенное для применения в области рентгенохирургии, содержащее: флакон с лиофилизатом полимерных микросфер, насыщенных доксорубицина гидрохлоридом в соотношении 1:2, предназначенных для проведения химиоэмболизации; ампулу с раствором, содержащим 20 мг/мл коеновой кислоты, предназначенным для внутривенного введения с целью купирования болей.

Заключение. В результате исследования изучена возможность сорбции коеновой кислоты полимерными микросферами. Разработана технология получения насыщенных доксорубицина гидрохлоридом полимерных микросфер. Разработано комбинированное лекарственное средство, предназначенное для применения в области рентгенохирургии.

Ключевые слова: полимерные микросферы, эмболизация, доксорубицина гидрохлорид, химиоэмболизация микросферами, коеновая кислота, анальгетическое действие, рентгенохирургия

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

Вклад авторов. Т. А. Биткина, А. В. Басевич – авторы идеи. Т. А. Биткина – проведение экспериментов по разработке состава и технологии комбинированного лекарственного средства. Т. А. Биткина – проведение обработки данных. Т. А. Биткина, А. В. Басевич – написание текста статьи и обсуждение результатов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность компании ООО «Фарма Ген» в лице директора Александра Александровича Резяпкина за содействие при проведении исследований.

Для цитирования: Биткина Т. А., Басевич А. В. Разработка состава и технологии комбинированного лекарственного средства на основе микросфер с доксорубицина гидрохлоридом и коеновой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):118–125. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-118-125>

Development of the Composition and Technology of a Combined Drug Based on Microspheres with Doxorubicin Hydrochloride and Comenic Acid

Tatyana A. Bitkina^{1,2}✉, Anna V. Basevich¹

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

² LLC "Pharma Gene", 4A, Tikhoretsky av., Saint-Petersburg, 194064, Russia

✉ Corresponding author: Tatyana A. Bitkina. E-mail: tatiana.bitkina@pharminnotech.com

© Биткина Т. А., Басевич А. В., 2022

© Bitkina T. A., Basevich A. V., 2022

ORCID: Tatyana A. Bitkina – <http://orcid.org/0000-0002-6253-0213>; Anna V. Basevich – <http://orcid.org/0000-0002-6864-6794>.

Received: 09.03.2022

Revised: 16.05.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. In recent decades, the role of X-ray endovascular methods has been progressing in the treatment of oncology. It became possible to perform embolization not only to stop bleeding from a tumor, but also for the purpose of targeted delivery of chemotherapy drugs. However, of particular interest is the development of new combined drugs that combine cytostatic action, embolization of blood vessels that feed the tumor, and analgesia.

Aim. The aim of the study is to develop the composition and technology of a combined drug for parenteral administration, including lyophilized polymer microspheres saturated with doxorubicin hydrochloride and an injection solution of comenic acid.

Materials and methods. The study of the sorption of comenic acid by polymeric microspheres was carried out using the HPLC method. Analysis of the appearance of polymeric microspheres and obtaining their photographic images was carried out by microscopy using a microscope with a digital camera.

Results and discussion. The study made it possible to determine that comenic acid, unlike doxorubicin hydrochloride, is practically not sorbed by polymer microspheres, which justifies the expediency of including a solution of comenic acid in the composition of the finished dosage form in the form of a separate injection solution. It has been established that when obtaining lyophilized polymer microspheres saturated with doxorubicin hydrochloride, it is necessary to use water for injection as a solvent for doxorubicin hydrochloride lyophilisate. A combined medicinal product has been developed for use in the field of X-ray surgery, containing: a bottle with a lyophilisate of polymeric microspheres saturated with doxorubicin hydrochloride in a ratio of 1:2, intended for chemoembolization; an ampoule with a solution containing 20 mg/ml of comenic acid, intended for intravenous administration in order to relieve pain.

Conclusion. As a result of the study, the possibility of sorption of comenic acid by polymeric microspheres was studied. A technology has been developed for obtaining polymeric microspheres saturated with doxorubicin hydrochloride. A combined drug intended for use in the field of X-ray surgery has been developed.

Keywords: polymeric microspheres, embolization, doxorubicin hydrochloride, chemoembolization with microspheres, comenic acid, analgesic effect, x-ray surgery

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. Tatyana A. Bitkina, Anna V. Basevich – authors of the idea. Tatyana A. Bitkina – conducting experiments to develop the composition and technology of the combined drug. Tatyana A. Bitkina – data processing. Tatyana A. Bitkina, Anna V. Basevich – writing the text of the article and discussing the results.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to the Pharma Gene LLC company represented by the director Aleksander Aleksandrovich Rezyapkin for assistance in conducting research.

For citation: Bitkina T. A., Basevich A. V. Development of the composition and technology of a combined drug based on microspheres with doxorubicin hydrochloride and comenic acid. *Drug development & registration*. 2022;11(2):118–125. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-118-125>

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире наблюдается рост онкологических заболеваний. По оценке ученых к 2040 году количество ежегодных случаев заболевания раком возрастет на 47 процентов. При стабильности данной динамики смертность от онкологических заболеваний в скором времени может занять первое место, опередив сердечно-сосудистые заболевания¹.

За последние годы достигнуты значительные успехи в диагностике, лечении, повышении качества жизни больных в данной медицинской области. Но все же многие вопросы, связанные с терапией онкологических заболеваний, остаются недостаточно изученными.

Одним из наиболее перспективных направлений терапии злокачественных новообразований является химиоэмболизация микросферами, заключающаяся в локальном закупоривании артерий сферическими

частицами, насыщенными цитостатическим препаратом, в частности доксорубицина гидрохлоридом. Однако микросферы для проведения эмболизации в основном поставляются на отечественный рынок из других стран и имеют малое количество аналогов, вследствие чего для них характерна высокая стоимость [1–5].

Поскольку онкологические заболевания зачастую сопровождаются выраженными болевыми синдромами, одной из наиболее острых проблем в их лечении является обезболивание. Терапия злокачественных новообразований, как правило, включает применение анальгетиков «большой группы» (опиаты, опиоиды). Однако прием данных препаратов сопровождается серьезными побочными действиями и может вызывать лекарственную зависимость, что делает актуальным поиск новых ненаркотических анальгетических субстанций. Производные гамма-пирона изучались учеными с применением разных подходов, позволяя выявлять все новые и новые свойства данной группы соединений. Однако особый инте-

¹ World Health Organization. Available at: <https://www.who.int>. Accessed: 18.02.2022.

рес вызывает высокая анальгетическая активность 5-гидрокси-4-оксо-4Н-пиран-2-карбоновой кислоты (коеновой кислоты), метод лечения с использованием которой приводит к долговременному снятию болевого синдрома, в том числе у онкологических пациентов [6–8].

Вышеизложенное позволяет рассматривать комбинацию для эмболизации на основе полимерных микросфер, содержащих цитостатический препарат, и эффективного анальгетика – коеновой кислоты, как перспективное направление исследования в области онкотерапии и технологии получения лекарств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты и реактивы

Вода для инъекций (ФС.2.2.0019.18), «Натрия хлорид-СОЛОфарм» раствор для инфузий 0,9 % (ЛП-002485, ООО «ПРОТЕКС», Россия).

Объектами исследования стали:

- инъекционный раствор коеновой кислоты с концентрацией 20 мг/мл [9];
- лиофилизированные полимерные микросферы типоразмеров: 55–70 мкм, 80–105 мкм, 125–145 мкм, 160–200 мкм (в ненасыщенном виде);
- доксорубицина гидрохлорид в дозировке 50 мг [Доксорубицин-ЛЭНС® (Р N000005/01), АО «ВЕРО-ФАРМ», Россия].

Приборы и оборудование

Анализ внешнего вида полимерных микросфер и получение их фотографических изображений проводили методом микроскопии при помощи микроскопа Levenhuk D320L с цифровой камерой (Levenhuk, Inc., США). Количественное содержание активного компонента в растворе коеновой кислоты определяли при помощи хроматографа жидкостного/ионного «Стайер» (АО «Аквилон», Россия). Взвешивание реактивов осуществляли на весах MB 210-A (ООО «Сартосм», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный анализ литературных данных показал перспективность создания комбинации на основе полимерных микросфер с доксорубицина гидрохлоридом и коеновой кислоты как лекарственного средства для химиоэмболизации.

Ранее был разработан состав растворов коеновой кислоты и определена наибольшая концентрация, при которой они сохраняют свою стабильность в процессе хранения – 20 мг/мл [9].

На первом этапе исследования микросферы насыщали раствором коеновой кислоты, изучали надосадочную жидкость в течение трех месяцев, определяя количественное содержание коеновой кислоты и подлинность.

В ходе эксперимента наблюдали насыщение раствором микросфер, однако в процессе контроля надосадочной жидкости было установлено, что микросферы насыщены растворителем, но коеновая кислота микросферами не сорбируется.

При анализе данного процесса было сделано предположение о том, что функциональные группы микросфер и коеновой кислоты имеют одинаковый (отрицательный) ионный заряд, в следствие чего процесс сорбции не возможен (рисунок 1).

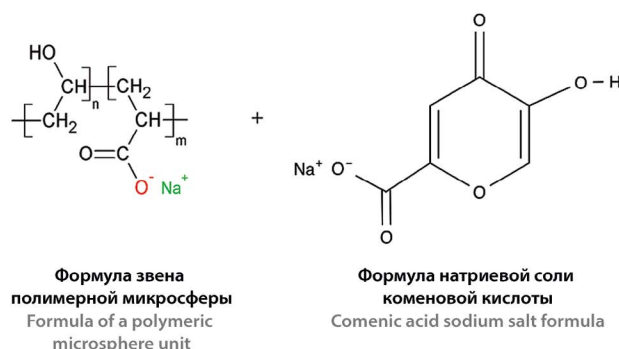


Рисунок 1. Структура коеновой кислоты и полимерных микросфер

Figure 1. Structure of comenic acid and polymeric microspheres

В связи с этим в составе комбинированного препарата раствор коеновой кислоты использовался в виде инъекционного раствора в ампулах.

Известно, что в химиоэмболизации для насыщения микросфер используют цитостатические лекарственные средства, в частности доксорубицина гидрохлорид [10]. Насыщение микросфер препаратом, как правило, производится специалистами в лечебных учреждениях непосредственно перед применением. Такая подготовка многостадийна (растворение лиофилизата доксорубицина гидрохлорида в физиологическом растворе, введение раствора доксорубицина гидрохлорида во флакон с микросферами, выдержка микросфер в растворе доксорубицина гидрохлорида для насыщения) и занимает не менее 2 часов. С целью оптимизации времени и стандартизации предоперационной подготовки была разработана готовая лекарственная форма, представляющая собой микросферы, насыщенные доксорубицина гидрохлоридом.

Для увеличения стабильности в процессе хранения микросферы, насыщенные доксорубицина гидрохлоридом в соотношении 1:2 (микросферы:доксорубицина гидрохлорид), сушили путем лиофилизации. В ходе исследования было получено четыре варианта исполнения сухих микросфер с доксорубицина гидрохлоридом в соответствии со схемой, изображенной на рисунке 2.

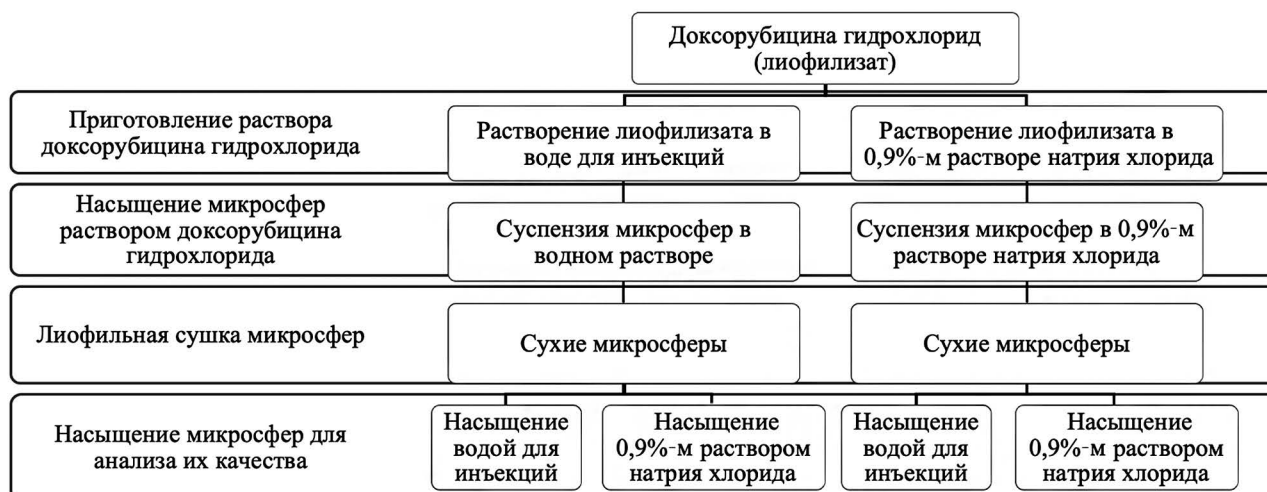


Рисунок 2. Схема получения микросфер с доксорубина гидрохлоридом

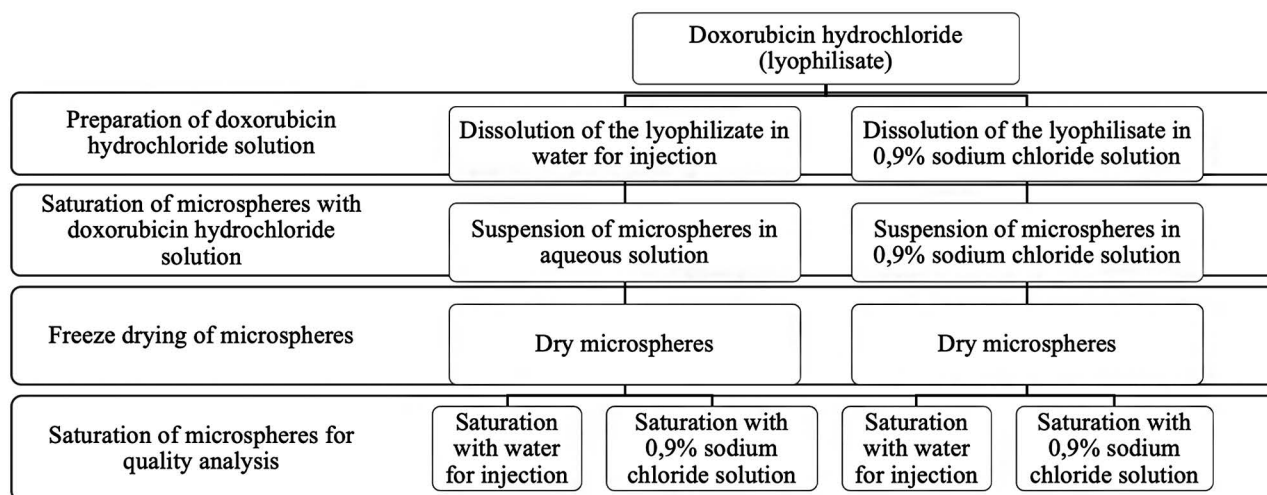


Figure 2. Scheme for obtaining microspheres with doxorubicin hydrochloride

Получение микросфер с доксорубина гидрохлоридом начинали с подготовки раствора доксорубина. Для этого лиофилизат препарата растворяли в воде для инъекций или физиологическом растворе. Затем проводили насыщение микросфер доксорубина гидрохлоридом, после чего осуществляли лиофильную сушку микросфер.

Для проверки качества полученные микросферы насыщали растворителями (водой для инъекций или физиологическим раствором) и анализировали внешний вид полученных частиц методом микроскопии (таблица 1).

Исследование высушенных после насыщения доксорубина гидрохлоридом микросфер показало, что в качестве раствора для насыщения предпочтительно использовать водный раствор доксорубина гидрохлорида для минимизации деформации поли-

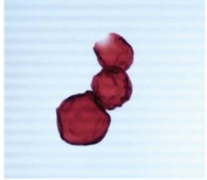
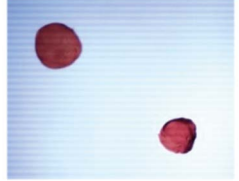
мера (таблица 1, вариант исполнения 3 и 4). Полученные таким образом микросферы при насыщении водой почти не отличались по внешнему виду от микросфер, насыщение которых производили 0,9%-м раствором натрия хлорида. Однако предпочтительным является 4 вариант исполнения, поскольку использование воды для инъекций в качестве «рабочего раствора» (раствора для насыщения микросфер перед введением) может приводить к изменению размера полимера, что приведет к его неконтрольному перемещению по кровеносным каналам.

На основе выбранной схемы получения насыщенных доксорубина гидрохлоридом микросфер была разработана технологическая схема их производства (рисунок 3).

В качестве первичной упаковки для насыщенных доксорубина гидрохлоридом микросфер выбра-

Таблица 1. Варианты исполнения полимерных микросфер, насыщенных доксорубицина гидрохлоридом

Table 1. Versions of polymer microspheres saturated with doxorubicin hydrochloride

Вариант исполнения Version	Фотографическое изображение, увеличение в 40 раз Photographic image, magnification 40 times	Наблюдения Observations
1. Доксорубицина гидрохлорид + 0,9%-й раствор натрия хлорида + микросферы ⇒ сушка ⇒ сухие микросферы с доксорубицина гидрохлоридом + 0,9%-й раствор натрия хлорида 1. Doxorubicin hydrochloride + 0,9 % sodium chloride solution + microspheres ⇒ drying ⇒ dry microspheres with doxorubicin hydrochloride + 0,9 % sodium chloride solution		Наблюдали значительную деформацию микросфер, сферичность частиц была нарушена, однако частицы при насыщении после сушки были эластичными и ярко окрашенными доксорубицина гидрохлоридом A significant deformation of the microspheres was observed, the sphericity of the particles was broken, however, the particles upon saturation after drying were elastic and brightly colored by doxorubicin hydrochloride
2. Доксорубицина гидрохлорид + 0,9%-й раствор натрия хлорида + микросферы ⇒ сушка ⇒ сухие микросферы с доксорубицина гидрохлоридом + вода для инъекций 2. Doxorubicin hydrochloride + 0,9 % sodium chloride solution + microspheres ⇒ drying ⇒ dry microspheres with doxorubicin hydrochloride + water for injections		
3. Доксорубицина гидрохлорид + вода для инъекций + микросферы ⇒ сушка ⇒ сухие микросферы с доксорубицина гидрохлоридом + вода для инъекций 3. Doxorubicin hydrochloride + water for injections + microspheres ⇒ drying ⇒ dry microspheres with doxorubicin hydrochloride + water for injections		Наблюдали небольшую деформацию микросфер, сферичность частиц менее нарушена в сравнении с вариантами исполнения 1 и 2. Микросферы эластичны, ярко окрашены доксорубицина гидрохлоридом A slight deformation of the microspheres was observed, the sphericity of the particles was less disturbed, in comparison with variants 1 and 2. The microspheres are elastic, brightly colored with doxorubicin hydrochloride
4. Доксорубицина гидрохлорид + вода для инъекций + микросферы ⇒ сушка ⇒ сухие микросферы с доксорубицина гидрохлоридом + 0,9%-й раствор натрия хлорида 4. Doxorubicin hydrochloride + water for injections + microspheres ⇒ drying ⇒ dry microspheres with doxorubicin hydrochloride + 0,9 % sodium chloride solution		

ны светлые стеклянные флаконы, резиновые пробки и быстросъемные колпачки flip-off. В качестве первичной упаковки для инъекционного раствора комоновой кислоты используются стеклянные ампулы из темного или светлого стекла.

Один флакон, содержащий 25 мг сухих микросфер размерного ряда 55–70 мкм или 80–105 мкм, или 125–145 мкм, или 160–200 мкм, насыщенных доксорубицина гидрохлоридом, и одну ампулу с раствором комоновой кислоты в дозировке 20 мг/мл объемом 10 мл помещают в пачку картонную с инструкцией. Варианты исполнения готовой лекарственной формы комбинированного препарата представлены в таблице 2.

Использование данной комбинации предполагает предварительное насыщение микросфер 0,9%-м раствором натрия хлорида с последующим введением полученной суспензии локально через катетер с целью эмболизации сосудов и проведения химиотерапии. Раствор комоновой кислоты вводится внутривенно до или после проведения процедуры эмболизации для купирования болевого синдрома. Содержание в растворе 200 мг комоновой кислоты будет обеспечивать высокое анальгетическое действие в течение

6 часов, что позволит проводить процедуру эмболизации, снижая болевые ощущения при проведении процедуры и/или после нее.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что при насыщении микросфер раствором комоновой кислоты не возникает процесса сорбции.
2. Разработана технология получения насыщенных доксорубицина гидрохлоридом полимерных микросфер, представлена технологическая схема их производства.
3. Разработано комбинированное лекарственное средство, предназначенное для применения в области рентгенохирургии, содержащее:
 - флакон с лиофилизатом полимерных микросфер размерного ряда 55–70 мкм, 80–105 мкм, 125–145 мкм, 160–200 мкм, насыщенных доксорубицина гидрохлоридом в соотношении 1:2, предназначенных для проведения химиоэмболизации;
 - ампулу с раствором, содержащим 20 мг/мл комоновой кислоты, предназначенным для внутривенного введения с целью купирования болей.

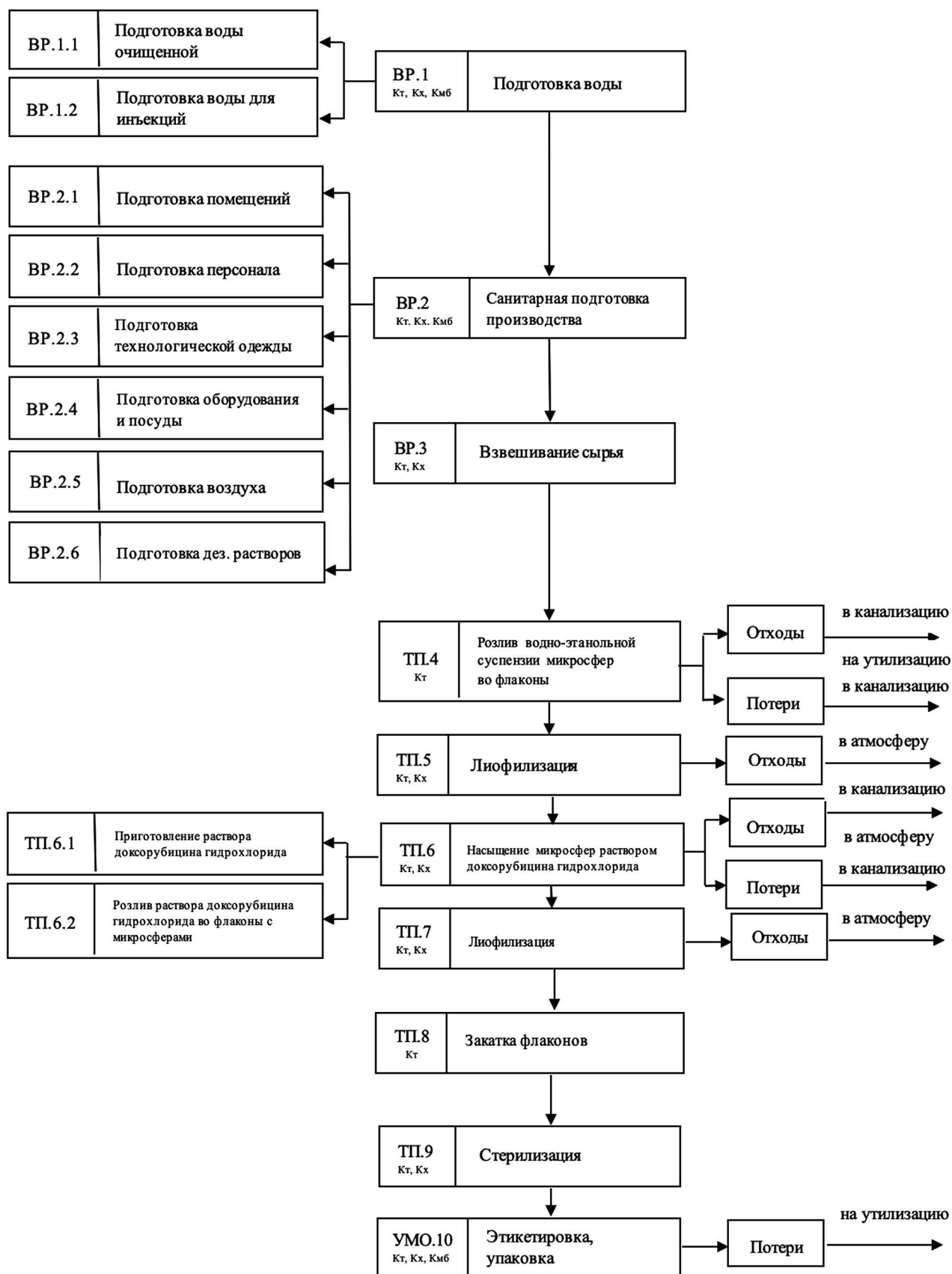


Рисунок 3. Технологическая схема производства полимерных микросфер, насыщенных доксорубина гидрохлоридом (Кт, Кх, Кмб – контроль технологический, химический, микробиологический)

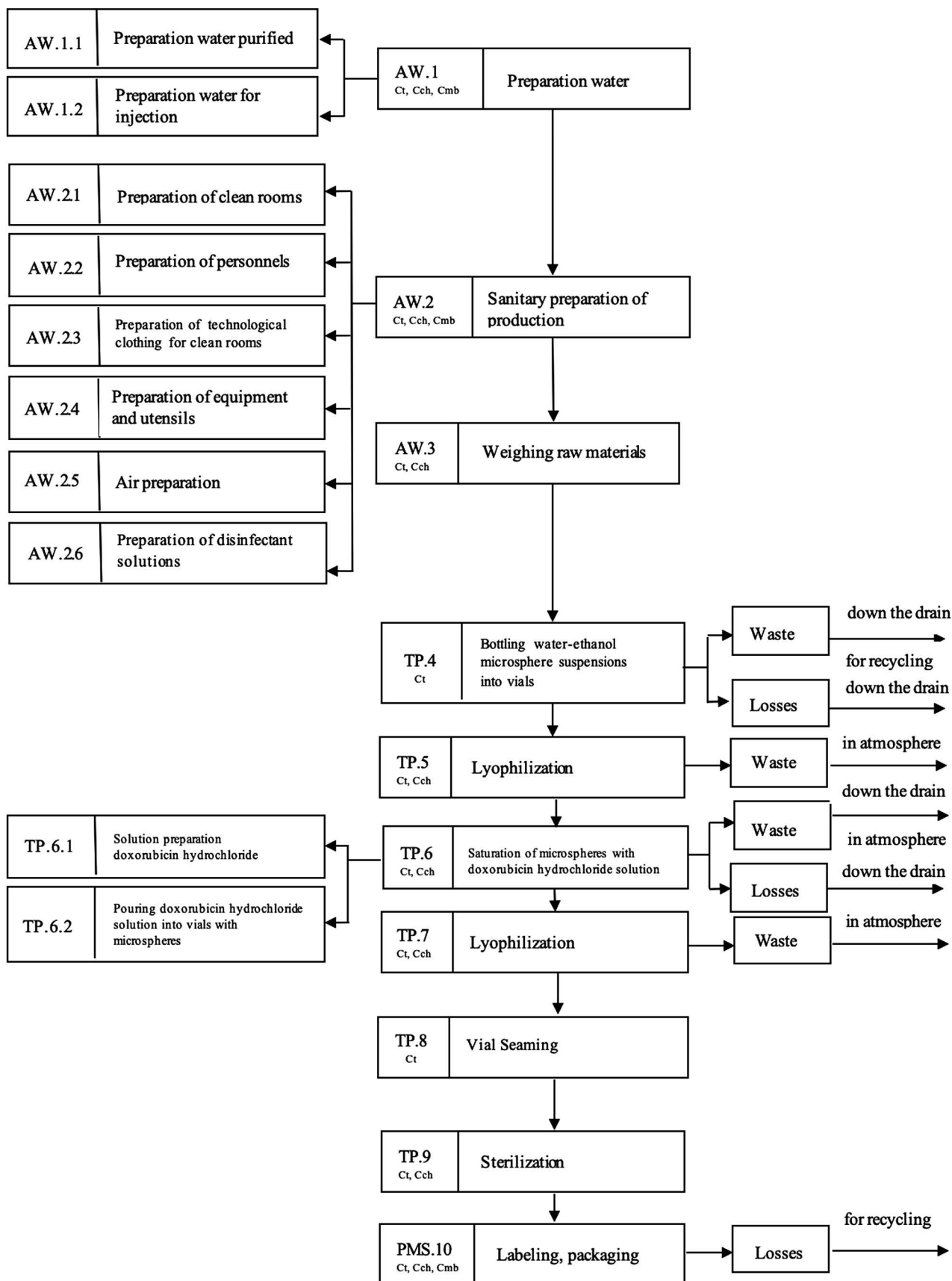


Figure 3. Technological scheme for the production of polymer microspheres saturated with doxorubicin hydrochloride (Ct, Cch, Cmb – technological, chemical, microbiological control)

Таблица 2. Варианты исполнения готовой лекарственной формы

Table 2. Options for the finished dosage form

Характеристики готовой лекарственной формы Characteristics of the finished dosage form	Варианты исполнения готовой лекарственной формы Options for the finished dosage form
Флакон с лиофилизатом полимерных микросфер с доксорубицина гидрохлоридом Bottle with lyophilisate of polymeric microspheres with doxorubicin hydrochloride	
Типоразмеры полимерных микросфер Standard sizes of polymeric microspheres	Типоразмер 1: 55–70 мкм Типоразмер 2: 80–105 мкм Типоразмер 3: 125–145 мкм Типоразмер 4: 160–200 мкм Size 1: 55–70 µm Size 2: 80–105 µm Size 3: 125–145 µm Size 4: 160–200 µm
Масса полимерных микросфер Mass of polymeric microspheres	25 мг 25 mg
Содержание доксорубицина гидрохлорида в микросферах The content of doxorubicin hydrochloride in microspheres	50 мг 50 mg
Ампула с инъекционным раствором коеновой кислоты Ampoule with an injection solution of Comenic acid	
Концентрация раствора коеновой кислоты Concentration of Comenic acid solution	20 мг/мл 20 mg/ml
Объем раствора в ампуле The volume of the solution in the ampoule	10 мл 10 ml

ЛИТЕРАТУРА

- Mikhail A. S., Negussie A. H., Mauda-Havakuk M., Owen J. W., Pritchard W. F., Lewis A. L., Wood B. J. Drug-eluting embolic microspheres: State-of-the-art and emerging clinical applications. *Expert Opin Drug Deliv.* 2021;18(3):383–398. DOI: 10.1080/17425247.2021.1835858.
- Delicque J., Guiu B., Boulon M., Schwanz H., Piron L., Cassinotto C. Liver chemoembolization of hepatocellular carcinoma using TANDEM® microspheres. *Future Oncol.* 2018;14(26):2761–2772. DOI: 10.2217/fon-2018-0237.
- Li J., Zhang B., Yue C., Wu J., Zhao L., Sun D., Wang R. Strategies to release doxorubicin from doxorubicin delivery vehicles. *Journal of drug targeting.* 2018;26(1):9–26. DOI: 10.1080/1061186X.2017.1363209.
- Биткина Т. А., Басевич А. В., Родин В. М. Критические точки производства полимерных микросфер, используемых в рентгенохирургии. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(3):28–35. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-28-35.
- Nouri Y. M., Kim J. H., Yoon H. K., Ko H. K., Shin J. H., Gwon D. I. Update on Transarterial Chemoembolization with Drug-Eluting Microspheres for Hepatocellular Carcinoma. *Korean Journal of Radiology.* 2019;20(1):34–49. DOI: 10.3348/kjr.2018.0088.
- Penniyaynen V. A., Plakhova V. B., Rogachevskii I. V., Terekhin S. G., Podzorova S. A., Krylov B. V. Molecular mechanisms and signaling by comenic acid in nociceptive neurons influence the pathophysiology of neuropathic pain. *Pathophysiology.* 2019;26(3–4):245–252. DOI: 10.1016/j.pathophys.2019.06.003.
- Rogachevskii I. V., Plakhova V. B., Penniyaynen V. A., Terekhin S. G., Podzorova S. A., Krylov B. V. New approaches to the design of analgesic medicinal substances. *Canadian journal of physiology and pharmacology.* 2022;100(1):43–52. DOI: 10.1139/cjpp-2021-0286.

- Dick O. E., Krylov B. V., Nozdachev A. D. Possible mechanism of bursting suppression in nociceptive neurons. *Doklady. Biochemistry and biophysics.* 2017;473(1):137–140. DOI: 10.1134/S1607672917020120.
- Биткина Т. А., Басевич А. В. Разработка и изучение стабильности растворов коеновой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(4):108–114. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-108-114.
- Lakkakula J. R., Gujarathi P., Pansare P., Tripathi S. A comprehensive review on alginate-based delivery systems for the delivery of chemotherapeutic agent: Doxorubicin. *Carbohydrate polymers.* 2021;259:117696. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.117696.

REFERENCES

- Mikhail A. S., Negussie A. H., Mauda-Havakuk M., Owen J. W., Pritchard W. F., Lewis A. L., Wood B. J. Drug-eluting embolic microspheres: State-of-the-art and emerging clinical applications. *Expert Opin Drug Deliv.* 2021;18(3):383–398. DOI: 10.1080/17425247.2021.1835858.
- Delicque J., Guiu B., Boulon M., Schwanz H., Piron L., Cassinotto C. Liver chemoembolization of hepatocellular carcinoma using TANDEM® microspheres. *Future Oncol.* 2018;14(26):2761–2772. DOI: 10.2217/fon-2018-0237.
- Li J., Zhang B., Yue C., Wu J., Zhao L., Sun D., Wang R. Strategies to release doxorubicin from doxorubicin delivery vehicles. *Journal of drug targeting.* 2018;26(1):9–26. DOI: 10.1080/1061186X.2017.1363209.
- Биткина Т. А., Басевич А. В., Родин В. М. Critical points for the production of polymeric microspheres used in X-Ray surgery. *Drug development & registration.* 2020;9(3):28–35. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-28-35.
- Nouri Y. M., Kim J. H., Yoon H. K., Ko H. K., Shin J. H., Gwon D. I. Update on Transarterial Chemoembolization with Drug-Eluting Microspheres for Hepatocellular Carcinoma. *Korean Journal of Radiology.* 2019;20(1):34–49. DOI: 10.3348/kjr.2018.0088.
- Penniyaynen V. A., Plakhova V. B., Rogachevskii I. V., Terekhin S. G., Podzorova S. A., Krylov B. V. Molecular mechanisms and signaling by comenic acid in nociceptive neurons influence the pathophysiology of neuropathic pain. *Pathophysiology.* 2019;26(3–4):245–252. DOI: 10.1016/j.pathophys.2019.06.003.
- Rogachevskii I. V., Plakhova V. B., Penniyaynen V. A., Terekhin S. G., Podzorova S. A., Krylov B. V. New approaches to the design of analgesic medicinal substances. *Canadian journal of physiology and pharmacology.* 2022;100(1):43–52. DOI: 10.1139/cjpp-2021-0286.
- Dick O. E., Krylov B. V., Nozdachev A. D. Possible mechanism of bursting suppression in nociceptive neurons. *Doklady. Biochemistry and biophysics.* 2017;473(1):137–140. DOI: 10.1134/S1607672917020120.
- Биткина Т. А., Басевич А. В. Development and study of the stability of comenic acid solutions. *Drug development & registration.* 2021;10(4):108–114. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-108-114.
- Lakkakula J. R., Gujarathi P., Pansare P., Tripathi S. A comprehensive review on alginate-based delivery systems for the delivery of chemotherapeutic agent: Doxorubicin. *Carbohydrate polymers.* 2021;259:117696. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.117696.

Разработка таблеток для приема внутрь на основе дигидрокверцетина и оценка их общетоксического действия

С. А. Абдулраззак¹, А. Н. Воробьев¹✉, Н. И. Синицына¹, И. В. Шарутин¹, О. В. Меньшова¹,
Е. В. Елизарова¹, Ю. В. Иванов¹, А. С. Карамян¹, Р. А. Абрамович², О. Г. Потанина²,
К. М. Саканян³

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

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

³ ООО «Национальный центр стандартных образцов», 117186, Россия, г. Москва, ул. Нагорная, д. 3а, пом./ком. 1/24–34, 36

✉ Контактное лицо: Воробьев Александр Н. E-mail: alek_san2007@mail.ru

ORCID: С. А. Абдулраззак – <http://orcid.org/0000-0001-6169-7575>; А. Н. Воробьев – <http://orcid.org/0000-0002-7182-9911>; Н. И. Синицына – <http://orcid.org/0000-0001-8564-497X>;
И. В. Шарутин – <http://orcid.org/0000-0002-6005-4962>; О. В. Меньшова – <http://orcid.org/0000-0001-6770-7770>; Е. В. Елизарова – <http://orcid.org/0000-0003-3361-7157>;
Ю. В. Иванов – <http://orcid.org/0000-0003-3787-8717>; А. С. Карамян – <http://orcid.org/0000-0003-2112-673X>; Р. А. Абрамович – <http://orcid.org/0000-0003-1784-881X>;
О. Г. Потанина – <http://orcid.org/0000-0002-0284-419X>; К. М. Саканян – <http://orcid.org/0000-0002-2028-2776>.

Статья поступила: 17.01.2022

Статья принята в печать: 20.05.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Дигидрокверцетин – флавоноид, обладающий широким спектром фармакологической активности. Установлен его позитивный терапевтический профиль при хронической венозной недостаточности, хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астме, для предупреждения инсульта. Его использование приводит к улучшению течения атеросклероза и болезни Альцгеймера. Кроме того, для него характерны радиопротекторное, противовоспалительное, противоаллергическое, репаративное, гепатопротекторное действия. В настоящее время лекарственных препаратов, содержащих дигидрокверцетин, на отечественном фармацевтическом рынке нет. Однако выраженный терапевтический потенциал дигидрокверцетина экономическая и технологическая доступность его субстанции свидетельствуют об актуальности разработки лекарственных форм на основе настоящей молекулы.

Цель. Разработка оптимального состава и технологии таблеток на основе дигидрокверцетина и оценка их физико-химических свойств, общетоксического действия и безопасности.

Материалы и методы. Таблетки получали методом прямого прессования на лабораторном роторном прессе XS press (Robert Bosch GmbH, Германия). Сыпучесть и насыпную плотность порошков определяли на приборе ERWEKA GT (ERWEKA GmbH, Германия). Испытания таблеток на прочность и геометрические размеры проводили на тестере SOTAX HT1 (SOTAX AG, Швейцария), истираемость таблеток определяли на тестере SOTAX F2 (SOTAX AG, Швейцария), распадаемость определяли на тестере DISI-A Touch (CHARLES ISCHI AG, Швейцария). Использована субстанция дигидрокверцетина компании ООО «Химия Древесины». В качестве вспомогательных веществ использовали силикатированную целлюлозу, предназначенную для прямого прессования, аэросил 200, натрия крахмала гликолят и магния стеарат. Качественное и количественное содержание дигидрокверцетина в таблетках определяли с использованием ВЭЖХ-УФ (Agilent 1260 Infinity II). Таблетки растворяли в определенном объеме подвижной фазы, а затем фильтровали раствор (0,22 мкм шприцевые фильтры PTFE, VWR, США). Использовали следующие реактивы: ацетонитрил для хроматографии и кислоту фосфорную концентрированную, ч.д.а., ГФ РФ XIV, ОФС.1.3.0001.15 «Реактивы. Индикаторы». Подвижную фазу А получали растворением 40 мл ацетонитрила в воде очищенной. В качестве подвижной фазы Б использовали 1%-й раствор фосфорной кислоты. Хроматографирование пробы объемом 10 мкл в течение 30 мин осуществляли на колонке Luna C18 150 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм при температуре колонки 35 °С, скорости потока – 1 мл/мин. Использовали УФ-детектор, 290 нм. Градиентные условия: время, мин – 0; подвижная фаза А-80; подвижная фаза Б-20. Определение острой, подострой токсичности и местно-раздражающего действия проводили по общепринятой методике согласно ГФ РФ XIV на половозрелых самцах и самках белых мышей и крыс в лаборатории патоморфологии и лекарственной токсикологии ЦКП (НОЦ) РУДН. Исследование проводили на 36 здоровых половозрелых аутбредных мышах с массой тела 18–20 г и на 30 здоровых половозрелых аутбредных крысах массой тела 180–200 г. Изучаемые таблетки вводили животным однократно внутривентрикулярно при помощи атравматического зонда в виде суспензии, приготовленной на 1%-й крахмальной слизи. Препаратом сравнения служила 1%-я крахмальная слизь. Длительность наблюдения за лабораторными животными составляла 14 дней при исследовании острой токсичности и 30 дней при оценке подострой. Ежедневно проводили клинический осмотр животных, оценивали физиологические показатели, фиксировали состояние. Выбор доз осуществлялся согласно уже имеющимся данным о токсичности требованиям, описанным в нормативной документации OECD № 425. Подробный клинический осмотр животного осуществляется в клетке содержания, в руках и на открытой площадке. Отмечали проявление и выраженность, где приемлемо, признаков интоксикации. Частота осмотра зависела от выраженности картины интоксикации, но не реже чем на 2-й, 7-й и 14-й день эксперимента. Масса тела регистрировалась непосредственно перед введением на 2-е, 7-е сутки и непосредственно перед эвтаназией. Ежедневно визуально регистрировались отклонения в потреблении животными корма и воды в групповых посадочных клетках. Лишение корма производилось в ночь перед эвтаназией. Животные лишались корма, но не воды. Животных подвергали эвтаназии помещением в эксикационную камеру с эфиром через 14 дней после введения изучаемого препарата и препарата сравнения.

Результаты и обсуждение. Определены технологические характеристики субстанции дигидрокверцетина для реализации технологического процесса изготовления таблеток на его основе. Установлено, что субстанция дигидрокверцетина имеет очень плохую сыпучесть. Для улучшения технологических свойств субстанции использовали 4 вида вспомогательных веществ, позволяющие улучшить технологические свойства действующего вещества. Подобраны условия хроматографирования для определения дигидрокверцетина в таблетках методом ВЭЖХ-УФ. Определена летальная доза при однократном введении, оценены токсические эффекты при многократном

© Абдулраззак С. А., Воробьев А. Н., Синицына Н. И., Шарутин И. В., Меньшова О. В., Елизарова Е. В., Иванов Ю. В., Карамян А. С., Абрамович Р. А., Потанина О. Г., Саканян К. М., 2022
© Abdulrazzak S. A., Vorobyev A. N., Sinitsyna N. I., Sharutin I. V., Menshova O. V., Elizavova E. V., Ivanov Yu. V., Karamyan A. S., Abramovich R. A., Potanina O. G., Sakanyan K. M., 2022

повторном введении препарата «Дигидрокверцетин» в лекарственной форме таблетки для приема внутрь. На лабораторных животных оценено местно-раздражающее действие препарата при пероральном применении. В ходе проведенных экспериментов установлено отсутствие местно-раздражающего действия при применении таблеток на основе дигидрокверцетина, при определении класса токсичности препарат отнесен к III классу «умеренно токсичных» веществ. На основании результатов субхронического эксперимента можно рассчитать индекс безопасности (ИБ) воспроизведенного препарата «Дигидрокверцетин, таблетки 20 мг» при применении в клинике в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Заключение. В результате проведенных исследований разработаны состав и технология таблеток на основе дигидрокверцетина. Установлено, что оптимальная композиция для изготовления таблеток с дигидрокверцетином методом прямого прессования должна содержать наполнитель силикатированную целлюлозу, натрия крахмала гликолят, глицерин, аэросил и скользящий агент – магния стеарат. В ходе таблетирования подобраны режимы прессования. Оптимальная сила прессования – 5 кН. Глубина наполнения составила – 7 мм. Оптимальное разведение пуансонов оказалось равным 2,5 мм. Скорость ротора была постоянной и составляла 15 об/мин. Скорость работы питателя 25 об/мин. Разработана и валидирована методика ВЭЖХ-УФ для идентификации и определения количественного содержания дигидрокверцетина в таблетках. Показано, что на хроматограмме таблеток помимо основного пика определяются пики биофлавононов эриодиктиола и кверцетина. Это может способствовать расширению спектра фармакологической активности полученных таблеток. Проведена оценка общетоксического действия и безопасности таблеток дигидрокверцетина. Установлена среднесмертельная доза препарата (LD_{50}), которая при пероральном применении мышам соответствовала 159 мг/кг. Внутривенное применение на протяжении месяца изучаемых таблеток в дозе 100 и 200 мг/кг не вызывает патологических изменений во внутренних органах подопытных животных. При изучении гематологических и биохимических показателей крови, а также массы внутренних органов на различных сроках введения достоверных различий с группой контрольных животных не выявлено.

Ключевые слова: таблетки, дигидрокверцетин, прямое прессование, вспомогательные вещества, ВЭЖХ-УФ, острая токсичность, многократное введение, местно-раздражающее действие

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

Вклад авторов. С. А. Абдулраззак провел эксперимент по разработке состав и технологии. А. Н. Воробьев написал текст статьи. Н. И. Синицына сделала обзор литературы, участвовала в написании текста. И. В. Шарутин, О. В. Меньшова участвовали в разработке методики ВЭЖХ. Е. В. Елизарова провела статистическую обработку данных. А. С. Карамян участвовала в написании текста, проведении доклинических испытаний. Р. А. Абрамович осуществила дизайн исследования. Ю. В. Иванов, К. М. Саканян проводили обработку данных. О. Г. Потанина участвовала в методологии и в дизайне исследования.

Для цитирования: Абдулраззак С. А., Воробьев А. Н., Синицына Н. И., Шарутин И. В., Меньшова О. В., Елизарова Е. В., Иванов Ю. В., Карамян А. С., Абрамович Р. А., Потанина О. Г., Саканян К. М. Разработка таблеток для приема внутрь на основе дигидрокверцетина и оценка их общетоксического действия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):126–138. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-126-138>

Development of Dihydroquercetin-based Oral tablets and Evalution of the General Toxic Effect

Sayed A. Abdulrazzak¹, Alexander N. Vorobyev¹✉, Nina I. Sinitsyna¹, Igor V. Sharutin¹, Olga V. Menshova¹, Ekaterina V. Elizarova¹, Yuriy V. Ivanov¹, Arfenya S. Karamyan¹, Rimma A. Abramovich², Olga G. Potanina², Karen M. Sakanyan³

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

² Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia

³ LLC "National Center for Reference Materials", 3a/24–34, 36, Nagornaya str., Moscow, 117186, Russia

✉ Corresponding author: Alexander N. Vorobyev. E-mail: alek_san2007@mail.ru

ORCID: Sayed A. Abdulrazzak – <http://orcid.org/0000-0001-6169-7575>; Alexander N. Vorobyev – <http://orcid.org/0000-0002-7182-9911>;

Nina I. Sinitsyna – <http://orcid.org/0000-0001-8564-497X>; Igor V. Sharutin – <http://orcid.org/0000-0002-6005-4962>; Olga V. Menshova – <http://orcid.org/0000-0001-6770-7770>;

Ekaterina V. Elizarova – <http://orcid.org/0000-0003-3361-7157>; Yuriy V. Ivanov – <http://orcid.org/0000-0003-3787-8717>; Arfenya S. Karamyan – <http://orcid.org/0000-0003-2112-673X>;

Rimma A. Abramovich – <http://orcid.org/0000-0003-1784-881X>; Olga G. Potanina – <http://orcid.org/0000-0002-0284-419X>; Karen M. Sakanyan – <http://orcid.org/0000-0002-2028-2776>.

Received: 17.01.2022

Revised: 20.05.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. Dihydroquercetin is a flavonoid from the group of flavanones with a wide spectrum of pharmacological activity. Its positive therapeutic profile was established for chronic venous insufficiency, chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma, for the prevention of stroke. Its use leads to an improvement in the course of atherosclerosis and Alzheimer's disease. In addition, it is characterized by radio-protective, antidote, anti-inflammatory, anti-allergic, reparative, hepatoprotective effects. Currently, there are no drugs containing dihydroquercetin on the domestic pharmaceutical market. However, the pronounced therapeutic potential of dihydroquercetin, the economic and technological availability of its substance indicate the relevance of the development of dosage forms based on this molecule.

Aim. Development of the optimal composition and technology of tablets based on dihydroquercetin and assessment of their physico-chemical properties, general toxic effect and safety.

Materials and methods. The tablets were obtained by direct compression on a laboratory rotary XS press (Robert Bosch GmbH, Germany). The flowability and bulk density of the powders were checked by tester ERWEKA GT (ERWEKA GmbH, Germany). Tablets hardness and geometric dimensions were checked by tester SOTAX HT1 (SOTAX AG, Switzerland), the friability of the tablets was checked by tester SOTAX F2 (SOTAX AG, Switzerland), disintegration time was checked by tester DISI-A touch (CHARLES ISCHI AG, Switzerland). Pharmaceutical substance dihydroquercetin of the company "Khimiya Drevesiny" was used as an active pharmaceutical substance. Silicated cellulose for direct compression, aerosil 200, sodium starch glycolate and magnesium stearate were used as excipients. The qualitative and quantitative content of dihydroquercetin in tablets was determined using HPLC-UV (Agilent 1260 Infinity II). The tablets were dissolved in a certain volume of the mobile phase, and then the solution was filtered (0.22 microns PTFE syringe filters, VWR, USA). The following reagents were used: acetonitrile for chromatography and concentrated phosphoric acid, "BDA", Russian Pharmacopoeia XIV, OFS.1.3.0001.15 "Reagents. Indicators". Determination of acute, subacute toxicity and local irritant effect was carried out according to the generally accepted method according to Russian Pharmacopoeia XIV on mature male and female white mice and rats in the laboratory of Pathomorphology and Drug toxicology of the Central Research Laboratory (REC) of the RUDN. The

study was performed on 36 healthy sexually mature outbred mice with a body weight of 18–20 g and on 30 healthy sexually mature outbred rats with a body weight of 180–200 g. The drug is administered to animals once intragastrically with the help of an atraumatic probe in the form of a suspension prepared from crushed DQV tablets on 1 % starch gel. The comparison preparation was 1 % starch gel. The duration of observation of laboratory animals is 14 days for the study of acute toxicity and 30 days for the assessment of subacute. Daily clinical examination of the animals was performed, physiological parameters were evaluated, and the condition was recorded. The choice of doses was carried out according to the already available data on toxicity requirements described in the OESD regulatory documentation No. 425. A detailed clinical examination of the animal is carried out in the holding cage, in the hands and in the open area. Note the manifestation and expression, where acceptable, of signs of intoxication. The frequency of the examination depends on the severity of the intoxication pattern, but not less often than on the 2nd, 7th and 14th day of the experiment. Body weight is recorded immediately, on the 2nd, 7th day, and immediately before euthanasia. Deviations in the consumption of feed and water by the animals in the group planting cages are recorded visually on a daily basis. Food deprivation is performed the night before euthanasia. Animals are deprived of food, but not water. The animals are subjected to euthanasia by being placed in an ether-containing desiccation chamber 14 days after the administration of the study drug and the reference drug.

Results and discussion. The technological characteristics of the substance of dihydroquercetin for the implementation of the technological process of making tablets based on it have been determined. It has been found that the substance dihydroquercetin has very poor flowability. Four types of excipients were used to improve the technological properties of the active substance. In the course of tableting, the pressing modes were selected. The optimal pressing force was 5 kN. The depth of filling was – 7 kN. The optimal distance between of the punches was 2.5 mm. The rotor speed was constant at 15 rpm. The speed of the feeder is 25 rpm. Chromatography conditions were selected for the determination of dihydroquercetin in tablets by HPLC-UV method. The lethal dose for a single administration was determined, and the toxic effects of repeated administration of the drug dihydroquercetin in the dosage form of an oral tablet were evaluated. The local irritant effect of the drug during oral administration was evaluated in laboratory animals. In the course of the conducted experiments, the absence of a local irritant effect was established when using tablets based on dihydroquercetin, when determining the toxicity class, the drug is assigned to the III class of "Moderately toxic" substances.

Conclusion. The formulation and technology of tablets based on dihydroquercetin have been developed. It was found that the optimal composition for the manufacture of tablets with dihydroquercetin by direct compression should contain a filler silicated cellulose, sodium starch glycolate, aerosilglidant and a sliding agent – magnesium stearate. The HPLC-UV technique for identification and determination of the quantitative content of dihydroquercetin in tablets has been developed and validated. It is shown that in addition to the main peak, the peaks of bioflavones of eriodictyol and quercetin are determined on the chromatogram of tablets. This may contribute to the expansion of the spectrum of pharmacological activity of the tablets obtained. On the basis of the developed composition and production technology of tablets based on dihydroquercetin, an assessment of the general toxic effect and safety of the preparation based on bioflavonoids of the Daurian leaflet was carried out. The average lethal dose of the drug (LD_{50}) was established, which, when administered orally to mice, corresponded to 159 mg/kg. During the study, the clinical picture of intoxication was evaluated. With intragastric administration of the drug, at a dose of 159 mg/kg, the death of 50 % of the animals in the experimental group was observed.

Keywords: tablets, dihydroquercetin, direct compression, excipients, HPLC-UV, acute toxicity, repeated administration, local irritant effect

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. Sayed A. Abdulrazzak conducted an experiment on the development of composition and technology. Alexander N. Vorobyev wrote the text of the article. Nina I. Sinitsyna reviewed the literature review, text writing. Igor V. Sharutin, Olga V. Menshova participated in the development of HPLC technique. Ekaterina V. Elizarova performed statistical data processing. Arfenya S. Karamyan participated in writing the text, conducting preclinical trials. Rimma A. Abramovich designed the study. Yuriy V. Ivanov, Karen M. Sakanyan carried out data processing. Olga G. Potanina participated in the methodology and study design.

For citation: Abdulrazzak S. A., Vorobyev A. N., Sinitsyna N. I., Sharutin I. V., Menshova O. V., Elizarova E. V., Ivanov Yu. V., Karamyan A. S., Abramovich R. A., Potanina O. G., Sakanyan K. M. Development of dihydroquercetin-based oral tablets and evaluation of the general toxic effect. *Drug development & registration*. 2022;11(2):126–138. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-126-138>

ВВЕДЕНИЕ

Дигидрокверцетин представляет собой растительный флавоноид, относящийся к группе флавоноидов. Повышенный интерес последних лет к настоящей молекуле вызван широким спектром фармакологических эффектов, что позволяет использовать настоящее соединение в терапии заболеваний различного генеза [4–6]. Являясь активным антиоксидантом, дигидрокверцетин обезвреживает активные формы кислорода. Причем уровень антиоксидантной активности данного соединения сопоставим с таковой каротиноидов и α -токоферола [7]. Накопленный опыт клинического использования дигидрокверцетина ука-

зывает на его эффективность при ряде серьезных патологий, в числе которых: хроническая венозная недостаточность, предупреждение инсульта. Отмечалась также позитивная динамика при болезни Альцгеймера и атеросклероза [8]. У пациентов с обострением хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астмой дигидрокверцетин способствовал более полному восстановлению показателей внешнего дыхания [7, 9].

Дигидрокверцетин действует на определенные противоопухолевые механизмы и обладает противовирусной активностью [8]. Вектор его фармакологических эффектов включает также противовоспа-

лительное, противоаллергическое, репаративное, гепатопротекторное направления [8, 10]. Он способен восстановить тонус кровеносных сосудов и капилляров и нормализовать кровоток, восстановить слизистую желудка [11].

Однако несмотря на отмеченный внушительный терапевтический потенциал дигидрокверцетина, лекарственных препаратов на его основе на отечественном фармацевтическом рынке не зарегистрировано, хотя существует ряд биологически активных добавок. При этом источники получения дигидрокверцетина достаточно велики и легко доступны в экономическом и технологическом плане. Основное сырье для получения субстанции дигидрокверцетина – комлевая часть лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) или лиственницы даурской (*L. dahurica* Turcz.). Запасы данных растений в России обширны, позволяют получать субстанцию дигидрокверцетина для промышленных целей [4, 11]. Анализ субстанции дигидрокверцетина также не вызывает особенных затруднений, он реализуется методом ВЭЖХ [11].

Таким образом, принимая во внимание терапевтический потенциал дигидрокверцетина и доступность получения его субстанции, разработка лекарственных форм на его основе представляется актуальной задачей.

Учитывая вышеизложенное, **целью настоящего исследования** явилась разработка оптимального состава и технологии таблеток с дигидрокверцетином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Таблетки получали методом прямого прессования на лабораторном роторном прессе XS press (Robert Bosch GmbH, Германия). Сыпучесть и насыпную плотность порошков определяли на приборе ERWEKA GT (ERWEKA GmbH, Германия). Испытания таблеток на прочность и геометрические размеры проводили на тестере SOTAX HT1 (SOTAX AG, Швейцария), истираемость таблеток проверяли на тестере SOTAX F2 (SOTAX AG, Швейцария), распадаемость проверяли на тестере DISI-A Touch (CHARLES ISCHI AG, Швейцария).

Использована субстанция дигидрокверцетина компании ООО «Химия Древесины». В качестве вспомогательных веществ использовали силикатированную целлюлозу, предназначенную для прямого прессования, аэросил 200, натрия крахмала гликолят и магния стеарат.

Качественное и количественное содержание дигидрокверцетина в таблетках определяли с использованием ВЭЖХ-УФ (Agilent 1260 Infinity II). Таблетки растворяли в определенном объеме подвижной фазы, а затем фильтровали раствор (0,22 мкм шприцевые фильтры PTFE, VWR, США). Использовали следующие реактивы: ацетонитрил для хроматографии и кислоту фосфорную концентрированную (ч.д.а., ГФ РФ XIV, ОФС.1.3.0001.15 «Реактивы. Индикаторы») [12].

Определение острой, подострой токсичности и местно-раздражающего действия проводили по общепринятой методике согласно ГФ РФ XIV на половозрелых самцах и самках белых мышей и крыс в лаборатории патоморфологии и лекарственной токсикологии ЦКП (НОЦ) РУДН [12]. Исследование проводили на 36 здоровых половозрелых аутбредных мышках с массой тела 18–20 г. Изучаемые таблетки вводили животным однократно внутрижелудочно при помощи атравматичного зонда в виде суспензии, приготовленной на 1%-м крахмальном геле. Препаратом сравнения служил 1%-й крахмальный гель. Длительность наблюдения за лабораторными животными составляла 14 дней при исследовании острой токсичности и 30 дней при оценке подострой. Ежедневно проводили клинический осмотр животных, оценивали физиологические показатели, фиксировали состояние.

Выбор доз осуществлялся согласно уже имеющимся данным о токсичности требованиям, описанным в нормативной документации OESD № 425 [1, 2]. Подробный клинический осмотр животного осуществляется в клетке содержания, в руках и на открытой площадке. Отмечали проявление и выраженность, где приемлемо, признаков интоксикации. Частота осмотра зависела от выраженности картины интоксикации, но не реже чем на 2-й, 7-й и 14-й день эксперимента. Масса тела регистрировалась непосредственно перед введением на 2-е, 7-е сутки и непосредственно перед эвтаназией. Ежедневно визуально регистрировались отклонения в потреблении животными корма и воды в групповых посадочных клетках. Лишение корма производилось в ночь перед эвтаназией. Животные лишались корма, но не воды. Животных подвергали эвтаназии помещением в эксикационную камеру с эфиром через 14 дней после введения изучаемого препарата и препарата сравнения [2, 3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определены технологические характеристики субстанции дигидрокверцетина, представленные в таблице 1.

Значения индекса Карра, приведенные в таблице 1, находятся в пределах 30, что характеризует очень плохую сыпучесть субстанции дигидрокверцетина. Субстанции с такой плохой сыпучестью не пригодны для прямого прессования. Сыпучесть дигидрокверцетина можно улучшить влажной грануляцией растворами пленкообразователей и последующей калибровкой гранулята через сито. Однако это усложняет и удорожает технологический процесс получения таблеток. Поэтому целесообразным явилось использование наполнителей, позволяющих улучшить технологические свойства действующего вещества для обеспечения технологии прямого прессования. В ходе экспериментов по выбору состава и количест-

венного содержания ингредиентов, входящих в состав таблеток, было выбрано оптимальное соотношение веществ, обеспечивающих получение таблеток методом прямого прессования, и качество которых отвечает требованиям ГФ РФ XIV. В таблице 2 приведен состав таблеток дигидрокверцетина.

Таблица 1. Технологические характеристики субстанции дигидрокверцетина

Table 1. Technological characteristics of the substance dihydroquercetin

Наименование показателя Characteristic name	Значение Value		
	№ серии субстанции Substance batch number		
	040319	061219	010220
Насыпная плотность до уплотнения, г/мл Bulk density before compaction, g/ml	0,376	0,372	0,380
Насыпная плотность после уплотнения, г/мл Bulk density after seal, g/ml	0,537	0,541	0,545
Сыпучесть (d воронки = 10 мм, 15 мм, 25 мм), г/с Bulk (d Funnels = 10 mm, 15 mm, 25 mm), g/s	Отсутствует Not applicable	Отсутствует Not applicable	Отсутствует Not applicable
Коэффициент Хауснера Hausner coefficient	1,42	1,45	1,43
Индекс Карра Carr index	30	28,8,0	27,8

Таблица 2. Состав таблеток дигидрокверцетина

Table 2. Formulation of dihydroquercetin tablets

Наименование сырья Name of component	Количество в одной таблетке Amount per tablet	
	мг mg	%
Дигидрокверцетин Dihydroquercetin	20,0	11,11
Силикатинизированная МКЦ (PROSOLV SMCC 90) Siliconized MCC	149,2	82,06
Натрия крахмала гликолят (VIVASTAR P) Sodium starch glycolate	9,0	5,00
Аэросил 200 Aerosil 200	1,5	0,83
Магния стеарат Magnesium stearate	1,8	1,00
Общая масса Total amount	180,0	100,00

Как следует из данных, приведенных в таблице 3, в состав таблеток входят 4 вида вспомогательных веществ. Около 82 % от массы таблетки составил наполнитель – силикатированная микрокристалличе-

ская целлюлоза, так как этот тип МКЦ имеет повышенную сыпучесть. Для улучшения сыпучести дигидрокверцетина и его распределения в смеси использовали аэросил 200. Дезинтегрант – натрия крахмала гликолят вводили в состав в количестве 5 %. В качестве лубриканта использовали магния стеарат (1 %).

В таблице 3 представлены результаты изучения технологических свойств массы для таблетирования.

Инструментально были определены насыпной объем порошковой массы до и после уплотнения, а также скорость ее истечения через воронку диаметром 10 мм. Были рассчитаны коэффициенты и плотность до и после уплотнения.

Таблица 3. Физико-химические и технологические показатели массы для таблетирования

Table 3. Physicochemical and technological parameters of tablet mixes

Наименование показателя Characteristic name	Значение Value
Насыпная плотность до уплотнения, г/мл Bulk density before compaction, g/ml	0,54 ± 0,03
Насыпная плотность после уплотнения 1250, г/мл Bulk density after sealing 1250, g/ml	0,64 ± 0,01
Коэффициент прессуемости Compressibility coefficient	15,5 ± 0,5
Сыпучесть (d воронки = 10 мм), с/100 г Flowability (d funnels = 10 mm), s/100 g	19,0 ± 0,2
Коэффициент Хауснера Hausner ratio	1,18 ± 0,5
Индекс Карра Carr index	15,6 ± 0,05
Влага, % Moisture content, %	6,88 ± 0,01

Как видно из данных таблицы 3, значения коэффициента прессуемости соответствуют значениям индекса Карра. Таблеточная масса обладала приемлемой сыпучестью, так как значение индекса Карра было незначительно, более 15. Силы когезии полученной таблеточной массы были не велики.

Полученные смеси таблетировали, используя пресс-инструмент 8 мм. В таблице 4 представлены результаты контроля качества полученных таблеток.

В ходе таблетирования подбирали режимы прессования. Сила прессования менялась в диапазоне от 10 до 2 кН, оптимальное составило – 5 кН. В диапазоне от 10 до 6 мм подбирали глубину наполнения, оптимум был достигнут при значении 7 мм. Разведение пуансонов изменяли в интервале от 1,2 до 3,0 мм. Качественные таблетки получались при разведении пуансонов, равным 2,5. Скорость ротора составляла 15 об/мин. Скорость работы питателя изменяли от 30 до 20 об/мин.

Таблица 4. Физико-химические и технологические показатели таблеток дигидрокверцетина

Table 4. Physicochemical and technological parameters of dihydroquercetin tablets

Наименование показателя Characteristic name	Значение Value
Описание: таблетки – гладкие, желтого цвета со светло-коричневыми вкраплениями, двояковыпуклые, круглые, сладковатого вкуса, со слабым специфическим древесным запахом Description: Tablets – smooth, yellow with light brown inclusions, double puff, round, sweet taste, with a weak specific wood smell	Соответствует Description matches
Средняя масса и однородность по массе, 180 мг ± 7,5 % Average mass and uniformity by mass, 180 mg ± 7.5 %	180,9 мг; (–1,7 %; +4,0 %)
Диаметр, мм Diameter, mm	8,00 ± 0,43
Высота, мм Height, mm	3,8 ± 0,35
Прочность, N Hardness, N	120 ± 6
Истираемость, % Friability, %	99,8 ± 0,5
Распадаемость, мин Disintegration, min	5 ± 1
Влага, % Moisture content, %	5,8 ± 0,20
Содержание дигидрокверцетина, мг, не менее 18 и не более 22 Dihydroquercetin content, mg, not less than 18 and not more than 22	20 ± 1
Однородность дозирования, AV ≤ 15 Content uniformity, AV ≤ 15	2,9 (весовым методом) Weight method
Растворение, не менее 75 % за 45 мин Solubility, at least 75 % for 45 min	97,2 ± 4,3
Родственные примеси: • дигидрокемперол ≤ 7,5 %; • единичная примесь ≤ 2,0 %; • сумма примесей ≤ 10,0 % Related impurities: • dihydrocamperol 7.5 %; • single impurity 2.0 %; • sum of impurities 10.0 %	дигидрокемперол – 4,5 %; единичная примесь – 1,1 %; сумма примесей – 5,6 %; dihydrocamperol – 4.5 %; single impurity – 1.1 %; total impurities – 5.6 %

Производство таблеток осуществлялось в соответствии с требованиями GMP в помещениях класса чистоты D по стандартной технологической схеме. Процесс производства таблеток дигидрокверцетина включает следующие стандартные процедуры:

- ✓ Взвешивание сырья.
- ✓ Требуемое количество дигидрокверцетина смешивают с аэросилом 200 для уменьшения сил когезии между молекулами субстанции с целью улучшения технологических характеристик таблеточной смеси.
- ✓ Смесь просеивают через сито 500 мкм для более равномерного смешения с целью улучшения сыпучести и однородности дозирования и загружают в

смеситель типа «Пьяная бочка», затем добавляют натрия крахмала гликолят, перемешивают пять минут. Затем в смеситель добавляют половину количества силикатинизированной МКЦ и смешивают в течение 10 минут, потом добавляют оставшуюся силикатинизированную МКЦ и перемешивают смесь в течение 40 минут.

- ✓ Магния стеарат перед добавлением в смесь для таблетирования просеивают через сито 500 мкм для более равномерного опудривания смеси для таблетирования.
- ✓ В смеситель добавляют предварительно просеянный магния стеарат и перемешивают еще 5 минут в смесителе типа «Пьяная бочка».
- ✓ Отбирают из полученной таблеточной массы пробу и отдают на анализ содержания дигидрокверцетина и однородность дозирования.
- ✓ Смесь таблетуют на таблеточном прессе. Каждые 10 минут делают межоперационный контроль и проверяют качество таблеток.

В результате проведенных исследований разработаны состав и технология таблеток на основе дигидрокверцетина.

Технологическая схема производства таблеток с дигидрокверцетином представлена на рисунке 1.

Установлено, что оптимальная композиция для изготовления таблеток с дигидрокверцетином методом прямого прессования должна содержать наполнитель – силикатированную целлюлозу, дезинтегрант – натрия крахмала гликолят, глйдант – аэросил и скользящий агент – магния стеарат. В ходе таблетирования подобран режим прессования.

Методом ВЭЖХ-УФ по разработанной и валидированной методике определяли наличие и количественное содержание дигидрокверцетина в таблетках.

На рисунке 2 представлены хроматограммы СО, на рисунке 3 изображена хроматограмма таблеток дигидрокверцетина.

В ходе исследований было показано, что на хроматограмме таблеток помимо основного пика определяются пики биофлавононов эриодиктиола и кверцетина. Для обнаруженных родственных примесей разработана и валидирована методика, установлены нормы. Найденные вещества, являясь флавоноидами, вносят вклад в суммарную фармакологическую активность полученных таблеток.

Разработанные таблетки были исследованы на безопасность. Установленные зависимые от доз летальные эффекты исследуемого препарата представлены в таблице 5.

Как следует из данных таблицы 5, для лабораторных мышей ЛД₅₀ исследуемых таблеток дигидрокверцетина составила 159 мг на кг массы животного, что позволило отнести препарат к III классу «Умеренно токсично» по «Классификации степеней токсичности по Hodge и Sterner» [3].

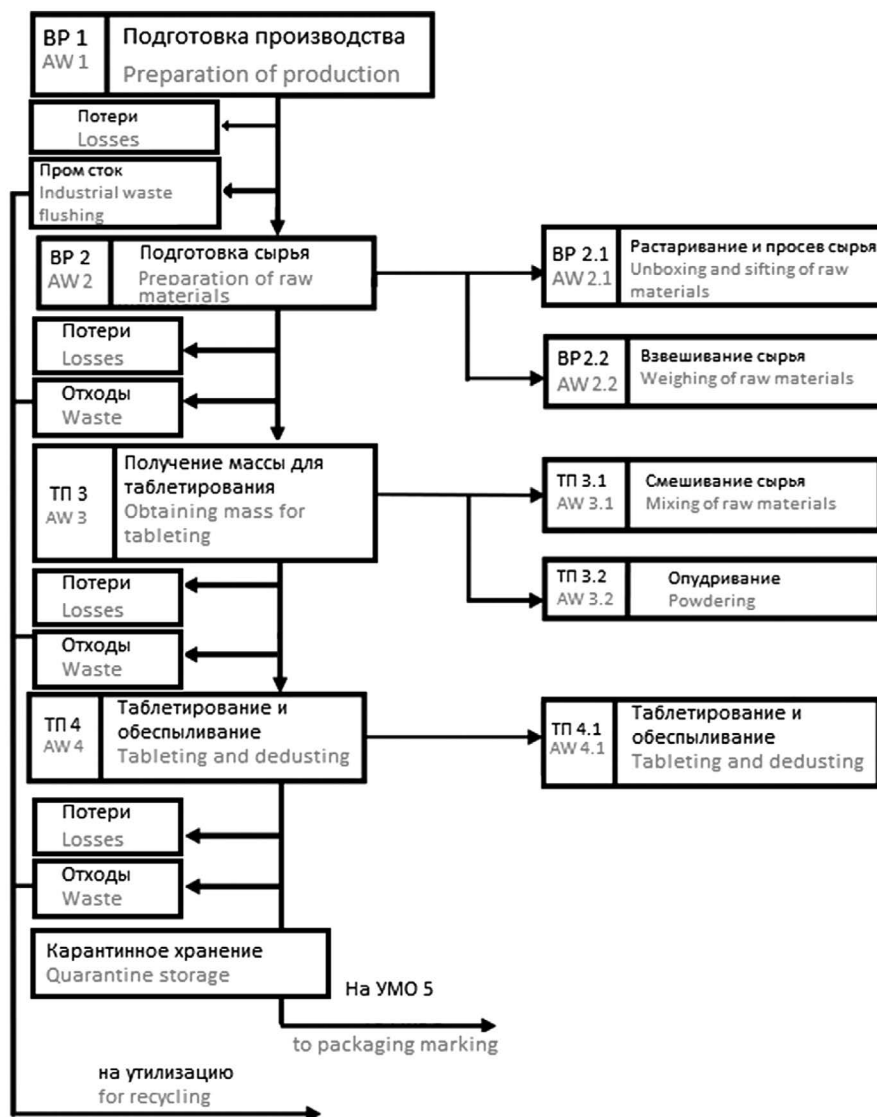


Рисунок 1. Технологическая схема производства таблеток с дигидрокверцетином

Figure 1. Technological process map of tablets with dihydroquercetin

Таблица 5. Токсичность изучаемого препарата при однократном в/ж введении мышам-самцам (пало/всего)

Table 5. Toxicity of the studied drug with intragastric administration to male mice (palo/total)

Введенная доза, мг/кг Administered dose, mg/kg	50	100	159	200	250
Таблетки дигидрокверцетина 20 мг Dihydroquercetin tablets	0/6	0/6	3/6	4/6	6/6
Контроль Control	0/6	0/6	3/6	4/6	6/6

При проведении исследования оценивалась клиническая картина интоксикации. В дозе 100 мг/кг у мышей токсических проявлений зафиксировано не было. При в/ж введении препарата в дозе 159 мг/кг наблюдалась гибель 50 % животных в подопытной группе. При вскрытии животных визуально было от-

мечено поражение желудочно-кишечного тракта (эрозии, геморрагия), избыточное скопление газов, истончение стенок желудка и кишечника; застойные явления в легких и печени, гиперемия легких и печени.

При анализе изменения массы тела белых мышей при однократном внутрижелудочном введении исследуемых таблеток дигидрокверцетина в различных группах достоверно значимых изменений не выявлено.

Результаты взвешивания выживших животных приведены в таблице 6.

После окончания эксперимента животные были подвергнуты эвтаназии. Морфометрическую оценку параметров органов животных осуществляли с помощью весов Unigram ET-T (ООО «ПетВес», Россия), с последующим вычислением массовых коэффициентов. Результаты вычисления массовых коэффициентов приведены в таблице 7.

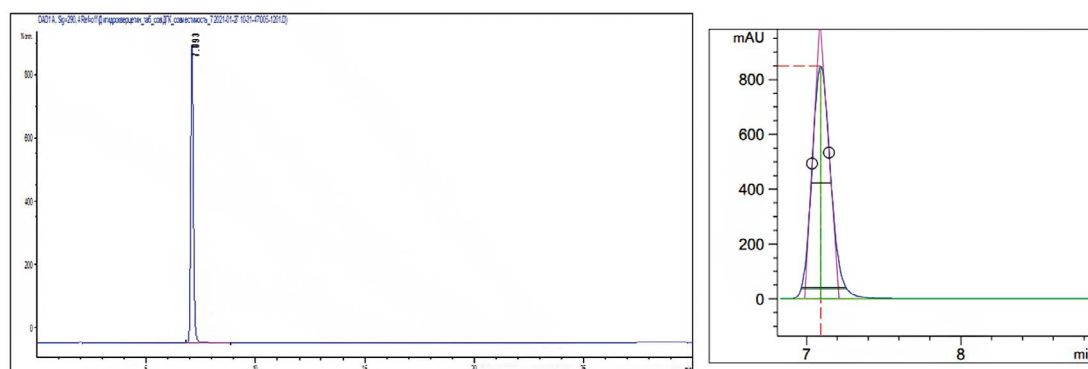
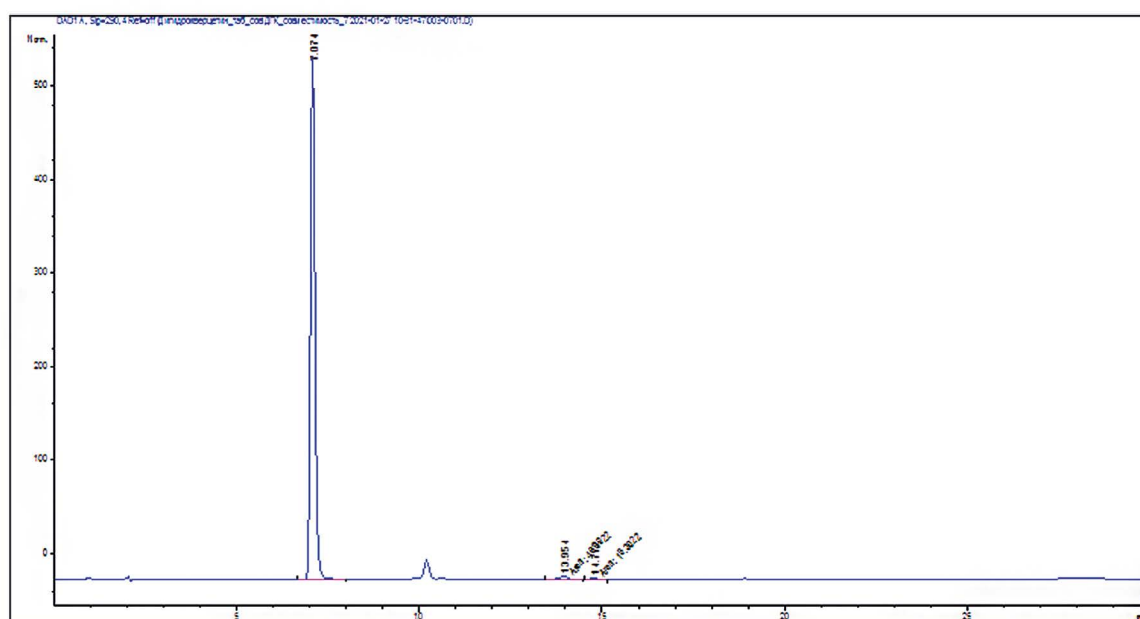
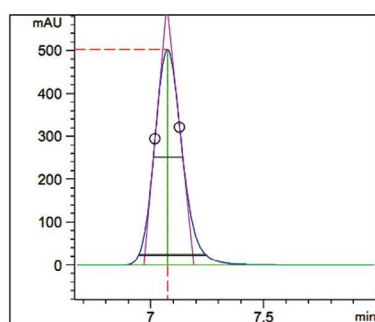


Рисунок 2. Хромотограмма стандартного образца дигидрокверцетина

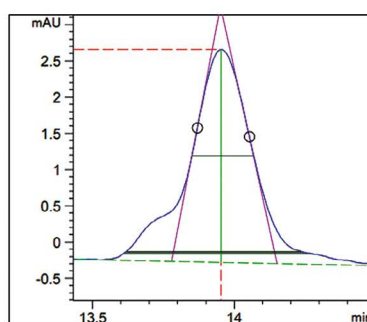
Figure 2. Chromatogram of dihydroquercetin Reference standard



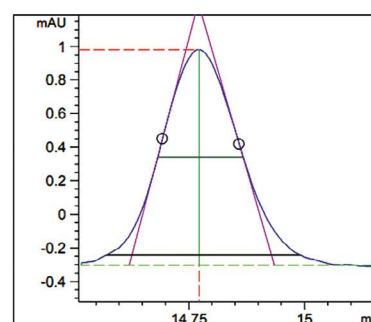
A
A



Б
B



В
C



Г
D

Рисунок 3. Хромотограмма таблеток дигидрокверцетина

а – общий вид; б – дигидрокверцетин; в – эридиктиол; г – кверцетин

Figure 3. Chromatogram of dihydroquercetin tablets

а – general view; б – dihydroquercetin; в – eridictiol; г – quercetin

Таблица 6. Влияние однократного введения изучаемого препарата на массу тела белых мышей при внутрижелудочном введении (г), ($n = 6$)

Table 6. The effect of a single administration of the studied drug on the body weight of white mice with intragastric administration (g), ($n = 6$)

Группа Group	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Время наблюдения Observation time			
		Фон Background	2-й день 2nd day	7-й день 7th day	14-й день 14th day
Таблетки дигидрохверцетина 20 мг Dihydroquercetin tablets 20 mg	50	18,0* ± 1,2	19,1* ± 0,2	23,5* ± 0,2	29,2* ± 0,5
	100	18,6* ± 1,4	19,0* ± 0,1	23,2* ± 0,4	29,3* ± 0,6
	159	19,1* ± 1,3	19,2* ± 0,5	–	–
	200	18,0* ± 0,4	–	–	–
	250	18,5* ± 0,3	–	–	–
Контроль Control	Плацебо Placebo	18,8* ± 0,4	19,6* ± 0,5	23,5* ± 0,4	29,8* ± 0,5

Примечание. * При уровне значимости $\alpha = 5\%$ и $n = 6$, значения p при расчете показателей D_n , X^2 превышали 0,05 при сравнении изучаемых групп между собой.

Note. * At a significance level of $\alpha = 5\%$ and $n = 6$, the p values when calculating the D_n , X^2 indicators exceeded 0.05 when comparing the studied groups with each other.

Таблица 7. Массовые коэффициенты (МК) органов белых мышей при однократном введении изучаемого препарата (%), ($n = 6$)

Table 7. Mass coefficients (MC) of organs of white mice with a single administration of the studied drug (%), ($n = 6$)

Группа Group	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Органы $M \pm m$ Organs $M \pm m$							
		Сердце Heart	Легкие с трахеей Lungs with trachea	Тимус Thymus	Печень Liver	Селезенка Spleen	Почка Kid	Надпочечник (левый) Adrenal gland (left)	Семенники Testicles
Дигидрохверцетин Dihydroquercetin	50	0,63* ± 0,03	0,81* ± 0,02	0,21* ± 0,03	5,57* ± 0,09	1,80* ± 0,08	1,78* ± 0,09	0,02* ± 0,009	1,69* ± 0,09
	100	0,65* ± 0,06	0,69* ± 0,03	0,19* ± 0,01	5,17* ± 0,22	1,76* ± 0,05	1,80* ± 0,05	0,02* ± 0,001	1,79* ± 0,07
	159	0,71* ± 0,06	0,68* ± 0,03	0,20* ± 0,01	5,11* ± 0,22	1,65* ± 0,05	1,62* ± 0,05	0,01* ± 0,001	1,65* ± 0,07
	200	0,69* ± 0,06	0,70* ± 0,03	0,21* ± 0,01	4,91* ± 0,22	1,71* ± 0,05	1,60* ± 0,05	0,03* ± 0,001	1,59* ± 0,07
	250	0,72* ± 0,06	0,70* ± 0,03	0,19* ± 0,01	4,87* ± 0,22	1,41* ± 0,05	1,50* ± 0,05	0,02* ± 0,001	1,72* ± 0,07
Контроль Control	Плацебо Placebo	0,73* ± 0,04	1,06* ± 0,05	0,19* ± 0,01	5,22* ± 0,19	1,50* ± 0,07	1,62* ± 0,06	0,01* ± 0,001	1,15* ± 0,1

Примечание. * При уровне значимости $\alpha = 5\%$ и $n = 6$, значения p при расчете показателей D_n , X^2 превышали 0,05 при сравнении изучаемых групп между собой.

Note. * At a significance level of $\alpha = 5\%$ and $n = 6$, the p values when calculating the D_n , X^2 indicators exceeded 0.05 when comparing the studied groups with each other.

Массовые коэффициенты органов белых мышей при однократном внутрижелудочном введении исследуемого препарата при дозе 100 мг/кг относительно контрольной группы показывают уменьшение массовых коэффициентов легких на 18% ($D_n = 0.152$, $p > 0,05$ при $n = 6$ и $\alpha = 5\%$) и увеличение массовых коэффициентов почек на 23% ($D_n = 0.152$, $p > 0,05$ при $n = 6$ и $\alpha = 5\%$);

Данные изменения массовых коэффициентов органов белых мышей были обусловлены токсическим действием высоких доз изучаемого препарата.

Внутрижелудочное применение препарата «Дигидрохверцетин, таблетки 20 мг» в течение 30 дней в дозе 100 и 200 мг/кг не вызывало у крыс изменений основных интегральных показателей.

Животные были активны, имели опрятный внешний вид. Потребление сухого корма и воды крыс-

ми I–III группы соответствовало контрольным показателям. В течение субхронического эксперимента ни в одной из экспериментальных групп не отмечено гибели животных.

В течение эксперимента наблюдали за испытываемыми животными, еженедельно регистрировали изменения массы тела. Прирост массы тела на сроке 2 недели у подопытных животных, получавших препарат «Дигидрохверцетин», не отличался от прироста массы тела контрольных животных.

Еженедельно проводили подсчет суточного потребления корма и воды. Количество потребления корма и воды крысами, получавшими вышеуказанные препараты, статистически не отличалось от показателей животных в контрольных группах.

В таблице 8–11 представлены данные по влиянию изучаемого препарата «Дигидрохверцетин, таблетки 20 мг» на основные биохимические показатели и на активность ферментов крови крыс. Исследование проводилось на биохимическом автоматическом анализаторе ILAB 650 (Instrumentation Laboratory, США).

Было отмечено достоверное повышение АЛТ на 18 % ($D_n = 0.152$, $p > 0,05$ при $n = 5$ и $\alpha = 5\%$) в группе подопытных животных, получавших препарат «Дигидрохверцетин, таблетки 20 мг» в дозе 200 мг/кг, что согласуется с установленными эффектами и токсическим воздействием высоких доз.

Достоверно значимых изменений в показателях крови не выявлено, незначительные колебания не являются критичными, не выходят за пределы физиологической нормы. Как видно из представленных выше данных, препараты как изучаемый, так и препарат сравнения в испытанной дозе не оказывают резко негативного влияния на основные биохимические показатели крови и активность ферментов плазмы крови.

На основании результатов субхронического эксперимента можно рассчитать индекс безопасности (ИБ) исследуемого препарата «Дигидрохверцетин, таблетки 20 мг» при применении в клинике в соответствии с прилагаемой инструкцией (крысы – доза 200 мг/кг; длительность введения – 30 дней; суточная доза для человека – 3,5 мг/кг; коэффициент пересчета с крысы на человека – 6,5).

Расчетный безопасный курс (РБК) препарата в днях равен:

$$\text{РБК} = \frac{200 \text{ мг/кг} \cdot 30}{3,5 \text{ мг/кг} \cdot 6,5} = 269.$$

Индекс безопасности (ИБ), представляющий собой соотношение расчетного курса и курса применения препарата в клинике в соответствии с инструкцией, составляет:

$$\text{ИБ} = \frac{269}{10} = 27.$$

Достоверно значимых изменений в показателях массы внутренних органов не выявлено, незначительные колебания не выходят за пределы нормы.

Таким образом, внутрижелудочное применение на протяжении месяца изучаемого препарата «Дигидрохверцетин, таблетки 20 мг» в дозе 100 и 200 мг/кг не вызывает патологических изменений во внутренних органах подопытных животных. При изучении гематологических и биохимических показателей крови, а также массы внутренних органов на различных сроках введения «Дигидрохверцетин, таблетки 20 мг» достоверных различий с группой контрольных животных не выявлено.

Таблица 8. Влияние изучаемого препарата «Дигидрохверцетин, таблетки 20 мг» на основные биохимические показатели периферической крови крыс-самцов, (фон) ($M \pm m$)

Table 8. Effect of the studied drug "Dihydroquercetin, tablets, 20 mg" on the main biochemical parameters of the peripheral blood of male rats, (background) ($M \pm m$)

Фон, ммоль/л Background, mmol/l		Мочевина Urea	Креатинин Creatinine	Общий билирубин Total bilirubin	АСТ Aspartate aminotransferase	АЛТ Alanine aminotransferase	Щелочная фосфатаза Alkaline phosphatase	Глюкоза Glucose	Общий белок Total protein	КФК Creatine kinase	ГГТ Gamma-glutamyl transpeptidase	Амилаза Amylase
		ммоль/л μmol/l	ммоль/л μmol/l	ммоль/л μmol/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	ммоль/л mmol/l	г/л g/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l
N		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Дигидрокверцетин Dihydroquercetin												
100 мг/кг 100 mg/kg	M ± m	4,96* ± 0,20	60,5* ± 1,9	2,04* ± 0,11	160,7* ± 2,2	60,1* ± 2,9	38,6* ± 1,7	4,62* ± 0,12	57,3* ± 2,3	193,6* ± 3,5	66,3* ± 3,4	207,4* ± 5,9
200 мг/кг 200 mg/kg	M ± m	5,05* ± 0,22	58,5* ± 3,1	2,05* ± 0,10	165,1* ± 3,1	61,5* ± 2,1	39,2* ± 2,3	4,95* ± 0,13	54,3* ± 2,4	192* ± 4,4	62,7* ± 2,8	205,6* ± 5,1
Контроль Control												
M ± m		5* ± 0,15	60* ± 2,1	1,72* ± 0,10	165,8* ± 3,76	59,2* ± 2,4	44,2* ± 2,1	4,83* ± 0,19	58,2* ± 2,0	192,8* ± 5,4	66,9* ± 2,2	188,6* ± 3,8

Примечание. * При уровне значимости $\alpha = 5\%$ и $n = 5$, значения p при расчете показателей D_n , X^2 превышали 0,05 при сравнении изучаемых групп между собой.

Note. * At the level of significance $\alpha = 5\%$ and $n = 5$, the values of p in the calculation of indicators D_n , X^2 exceeded.

* At a significance level of $\alpha = 5\%$ and $n = 5$, the p values when calculating the D_n , X^2 indicators exceeded 0.05 when comparing the studied groups with each other.

Таблица 9. Влияние изучаемого препарата «Дигидрокверцетин, таблетки 20 мг» на основные биохимические показатели периферической крови крыс-самцов, (через 30 дней) ($M \pm m$)

Table 9. The effect of the studied drug "Dihydroquercetin, tablets, 20 mg" on the main biochemical parameters of the peripheral blood of male rats, (after 30 days) ($M \pm m$)

30 дней, ммоль/л 30 days, mmol/l		Мочевина Urea	Креатинин Creatinine	Общий билирубин Total bilirubin	АСТ Aspartate aminotransferase	АЛТ Alanine aminotransferase	Щелочная фосфатаза Alkaline phosphatase	Глюкоза Glucose	Общий белок Total protein	КФК Creatine kinase	ГГТ Gamma-glutamyl transpeptidase	Амилаза Amylase
		ммоль/л μmol/l	ммоль/л μmol/l	ммоль/л μmol/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	ммоль/л mmol/l	г/л g/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l
N		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Дигидрокверцетин Dihydroquercetin												
100 мг/кг 100 mg/kg	$M \pm m$	5,18* $\pm$ 0,24	64,5* $\pm$ 2,3	1,88* $\pm$ 0,12	164,9* $\pm$ 3,4	63,3* $\pm$ 3,5	40,5* $\pm$ 2,4	4,6* $\pm$ 0,16	54,9* $\pm$ 2,7	187,4* $\pm$ 5,1	62,8* $\pm$ 2,0	197,1* $\pm$ 3,9
200 мг/кг 200 mg/kg	$M \pm m$	5,12* $\pm$ 0,24	62,4* $\pm$ 2,7	1,96* $\pm$ 0,12	163,3* $\pm$ 2,8	62,9* $\pm$ 2,0	37,4* $\pm$ 2,3	4,54* $\pm$ 0,11	59,1* $\pm$ 1,6	188,5* $\pm$ 5,1	64* $\pm$ 2,2	201,8* $\pm$ 3,1
Контроль Control												
$M \pm m$		4,98* $\pm$ 0,17	58,2* $\pm$ 1,3	1,79* $\pm$ 0,10	168,3* $\pm$ 3,50	61,2* $\pm$ 1,5	41,7* $\pm$ 2,0	4,9* $\pm$ 0,09	58,9* $\pm$ 2,1	184,2* $\pm$ 3,3	69,9* $\pm$ 2,9	189,7* $\pm$ 4,9

Примечание. * При уровне значимости $\alpha = 5\%$ и $n = 5$, значения p при расчете показателей D_n , X^2 превышали 0,05 при сравнении изучаемых групп между собой.

Note. * At a significance level of $\alpha = 5\%$ and $n = 5$, the p values when calculating D_n , X^2 indicators exceeded 0.05 when comparing the studied groups with each other.

Таблица 10. Влияние изучаемого препарата «Дигидрокверцетин, таблетки, 20 мг» на основные биохимические показатели периферической крови крыс-самок, (фон) ($M \pm m$)

Table 10. Effect of the studied drug "Dihydroquercetin, tablets, 20 mg" on the main biochemical parameters of the peripheral blood of female rats, (background) ($M \pm m$)

Фон, ммоль/л Background, mmol/l		Мочевина Urea	Креатинин Creatinine	Общий билирубин Total bilirubin	АСТ Aspartate aminotransferase	АЛТ Alanine aminotransferase	Щелочная фосфатаза Alkaline phosphatase	Глюкоза Glucose	Общий белок Total protein	КФК Creatine kinase	ГГТ Gamma-glutamyl transpeptidase	Амилаза Amylase
		ммоль/л μmol/l	ммоль/л μmol/l	ммоль/л μmol/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	ммоль/л mmol/l	г/л g/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l
N		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Дигидрокверцетин Dihydroquercetin												
100 мг/кг 100 mg/kg	$M \pm m$	4,71* $\pm$ 0,16	60,5* $\pm$ 1,2	1,88* $\pm$ 0,14	165,5* $\pm$ 3,1	60,3* $\pm$ 2,3	39,6* $\pm$ 2,1	4,55* $\pm$ 0,11	56,7* $\pm$ 3,1	194,8* $\pm$ 4,6	65,5* $\pm$ 2,6	190,8* $\pm$ 6,1
200 мг/кг 200 mg/kg	$M \pm m$	4,9* $\pm$ 0,13	58,7* $\pm$ 2,1	1,91* $\pm$ 0,09	163,4* $\pm$ 2,3	63,3* $\pm$ 2,1	38,5* $\pm$ 1,7	4,66* $\pm$ 0,14	61,7* $\pm$ 1,6	182,1* $\pm$ 4,8	68,9* $\pm$ 2,1	189,9* $\pm$ 4,8
Контроль Control												
$M \pm m$		4,92* $\pm$ 0,16	60,3* $\pm$ 1,8	1,82* $\pm$ 0,08	163,7* $\pm$ 2,60	65,3* $\pm$ 1,7	59,6* $\pm$ 1,7	4,66* $\pm$ 0,13	58,7* $\pm$ 2,1	189,5* $\pm$ 4,4	66,4* $\pm$ 3,2	186,3* $\pm$ 4,4

Примечание. * При уровне значимости $\alpha = 5\%$ и $n = 5$, значения p при расчете показателей D_n , X^2 превышали 0,05 при сравнении изучаемых групп между собой.

Note. * At a significance level of $\alpha = 5\%$ and $n = 5$, the p values when calculating D_n , X^2 indicators exceeded 0.05 when comparing the studied groups with each other.

Таблица 11. Влияние изучаемого препарата «Дигидрокверцетин, таблетки 20 мг», покрытые пленочной оболочкой, на основные биохимические показатели периферической крови крыс-самок, (через 30 дней) ($M \pm m$)

Table 11. Effect of the studied drug "Dihydroquercetin, tablets, 20 mg" film-coated on the main biochemical parameters of the peripheral blood of female rats, (after 30 days) ($M \pm m$)

30 дней, ммоль/л 30 days, mmol/l		Мочевина Urea	Креатинин Creatinine	Общий билирубин Total bilirubin	АСТ Aspartate aminotransferase	АЛТ Alanine aminotransferase	Щелочная фосфатаза Alkaline phosphatase	Глюкоза Glucose	Общий белок Total protein	КФК Creatine kinase	ГГТ Gamma-glutamyl transpeptidase	Амилаза Amylase
		ммоль/л μmol/l	ммоль/л μmol/l	ммоль/л μmol/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	ммоль/л mmol/l	г/л g/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l
N		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Дигидрокверцетин Dihydroquercetin												
100 мг/кг 100 mg/kg	M ± m	5,02* ± 0,16	59* ± 2,1	1,85* ± 0,12	169,5* ± 3,3	65,4* ± 1,9	40,4* ± 2,1	4,71* ± 0,11	55,6* ± 1,6	187,3* ± 6,3	67,6* ± 2,9	195* ± 5,5
200 мг/кг 200 mg/kg	M ± m	4,9* ± 0,17	60,1* ± 1,6	1,82* ± 0,12	167* ± 2,5	63,8* ± 2,6	41,9* ± 2,4	4,72* ± 0,13	57,8* ± 2,7	191,1* ± 4,0	69,4* ± 3,5	194,7* ± 2,8
Контроль Control												
M ± m		4,95* ± 0,22	60* ± 1,7	1,61* ± 0,11	166,2* ± 2,49	10* ± 2,6	57,4* ± 1,6	4,93* ± 0,17	58,3* ± 2,2	183,9* ± 6,2	69,2* ± 3,4	194* ± 4,1

Примечание. * При уровне значимости $\alpha = 5\%$ и $n = 5$, значения p при расчете показателей D_n , X^2 превышали 0,05 при сравнении изучаемых групп между собой.

Note. * At a significance level of $\alpha = 5\%$ and $n = 5$, the p values when calculating D_n , X^2 indicators exceeded 0.05 when comparing the studied groups with each other.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработаны состав и технология таблеток на основе дигидрокверцетина. Установлено, что оптимальная композиция для изготовления таблеток с дигидрокверцетином методом прямого прессования должна содержать наполнитель силикатированную целлюлозу, натрия крахмала гликолят, глидант аэросил и скользящий агент – магния стеарат. В ходе таблетирования подобраны режимы прессования. Оптимальной силой прессования явилась 5N. Глубина наполнения составила – 7. Оптимальное разведение пуансонов оказалось равным 2,5. Скорость ротора была постоянной и составляла 15 об/мин. Скорость работы питателя 25 об/мин.

Разработана и валидирована методика ВЭЖХ-УФ для идентификации и определения количественного содержания дигидрокверцетина в таблетках. Показано, что на хроматограмме таблеток помимо основного пика определяются пики биофлавононов эриодиктиола и кверцетина. Для обнаруженных родственных примесей установлены нормы. Найденные вещества, являясь флавоноидами, вносят вклад в суммарную фармакологическую активность полученных таблеток.

Проведена оценка общетоксического действия и безопасности таблеток дигидрокверцетина. Установлена среднесмертельная доза препарата (LD_{50}), которая при пероральном применении мышам соответствовала 159 мг/кг. При проведении исследования оценивалась клиническая картина интоксикации. При в/ж введении препарата в дозе 159 мг/кг наблюдалась гибель 50 % животных в подопытной группе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Прозоровский В. Б., Прозоровская М. П., Демченко В. М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки. *Фармакология и токсикология*. 1978;41(4):497–502.
2. Christudas S., Baojun X. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). *Phytochemistry*. 2019; 166:112066. DOI: 10.1016/j.phytochem.2019.112066.
3. Трахтенберг И. М. Проблемы нормы в токсикологии. М.: Медицина; 1991. 203 с.
4. Бабкин В. А., Остроухова Л. А., Малков Ю. А., Иванова С. З., Онучина Н. А., Бабкин Д. В. Биологически активные вещества древесных лиственных. *Химия в интересах устойчивого развития*. 2001;3:363–367.
5. Chen X., Gu N., Xue C., Li B. R. Plant flavonoid taxifolin inhibits the growth, migration and invasion of human osteosarcoma cells. *Molecular medicine reports*. 2018;17(2):3239–3245. DOI: 10.3892/mmr.2017.8271.
6. Yang C. L., Lin Y. S., Liu K. F., Peng W. H., Hsu C. M. Hepatoprotective mechanisms of taxifolin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Nutrients*. 2019;11:2655. DOI: 10.3390/nu1112655.

7. Yoon K. D., Lee J. Y., Kim T. Y., Kang H., Ha K. S., Ham T. H., Ryu S. N., Kang M. Y., Kim Y. H., Kwon Y. I. In vitro and in vivo anti-hyperglycemic activities of taxifolin and its derivatives isolated from pigmented rice (*Oryza sativa* L. cv. Superhongmi). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2020;68(3):742–750. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b04962.
8. Topal F., Nar M., Gocer H., Kalin P., Kocyigit U. M., Gülçin İ., Alwassel S. H. Antioxidant activity of taxifolin: an activity-structure relationship. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2016;31(4):674–683. DOI: 10.3109/14756366.2015.1057723.
9. Zhang Y., Yu J., Dong X. D., Ji H. Y. Research on characteristics, antioxidant and antitumor activities of dihydroquercetin and its complexes. *Molecules*. 2017;23(1):20. DOI: 10.3390/molecules23010020.
10. Гуськова Т. А. Токсикология лекарственных средств. М.: Русский врач; 2003. 133 с.
11. Wang W., Ma B.-L., Xu C.-G., Zhou X.-J. Dihydroquercetin protects against renal fibrosis by activating the Nrf2 pathway. *Phytomedicine*. 2020;69:1531854. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153185.
12. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 3. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2018. 5004 с.
4. Babkin V. A., Ostroukhova L. A., Malkov Yu. A., Ivanova S. Z., Onuchina N. A., Babkin D. V. Biologically active substances of larch wood. *Chemistry for sustainable development*. 2001;3:363–367. (In Russ.)
5. Chen X., Gu N., Xue C., Li B. R. Plant flavonoid taxifolin inhibits the growth, migration and invasion of human osteosarcoma cells. *Molecular medicine reports*. 2018;17(2):3239–3245. DOI: 10.3892/mmr.2017.8271.
6. Yang C. L., Lin Y. S., Liu K. F., Peng W. H., Hsu C. M. Hepatoprotective mechanisms of taxifolin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Nutrients*. 2019;11:2655. DOI: 10.3390/nu1112655.
7. Yoon K. D., Lee J. Y., Kim T. Y., Kang H., Ha K. S., Ham T. H., Ryu S. N., Kang M. Y., Kim Y. H., Kwon Y. I. In vitro and in vivo anti-hyperglycemic activities of taxifolin and its derivatives isolated from pigmented rice (*Oryza sativa* L. cv. Superhongmi). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2020;68(3):742–750. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b04962.
8. Topal F., Nar M., Gocer H., Kalin P., Kocyigit U. M., Gülçin İ., Alwassel S. H. Antioxidant activity of taxifolin: an activity-structure relationship. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2016;31(4):674–683. DOI: 10.3109/14756366.2015.1057723.
9. Zhang Y., Yu J., Dong X. D., Ji H. Y. Research on characteristics, antioxidant and antitumor activities of dihydroquercetin and its complexes. *Molecules*. 2017;23(1):20. DOI: 10.3390/molecules23010020.
10. Guskova T. A. Toxicology of drugs. Moscow: Russkiy vrach; 2003. 133 p. (In Russ.)
11. Wang W., Ma B.-L., Xu C.-G., Zhou X.-J. Dihydroquercetin protects against renal fibrosis by activating the Nrf2 pathway. *Phytomedicine*. 2020;69:1531854. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153185.
12. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed. V. 3. Moscow: Ministerstvo zdoravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii; 2018. 5004 p. (In Russ.)

REFERENCES



XVIII ежегодная межрегиональная конференция

гибридный онлайн/офлайн формат

**3 — 5 июля
2022 г.**

КОНФЕРЕНЦИЯ СО СВОЕЙ ИСТОРИЕЙ ПРОВЕДЕНИЯ



**ИЗВЕСТНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ В НОВОМ МЕСТЕ
И В НОВОМ ФОРМАТЕ • НИКАКИХ СКУЧНЫХ
ДОКЛАДОВ • ОТ ПРОФЕССИОНАЛОВ И ДЛЯ
ПРОФЕССИОНАЛОВ • ОБСУДИМ САМОЕ
ВАЖНОЕ В ОРГАНИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО
ОБЕСПЕЧЕНИЯ**

«АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОЙ И МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ»

ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

Пленарное заседание

- Доступность лекарственных препаратов и медицинских технологий: вызовы и пути их решения

Секционные заседания

- Нозологический фокус: клинические, экономические и организационные аспекты
- Внедрение и использование информационных технологий на различных этапах оказания медицинской и лекарственной помощи: региональный опыт
- Формирование потребности в лекарственных препаратах: участники, методические подходы, информационные системы, контроль
- Госзакупки и антисанкционное законодательство
- Аптечная секция

Круглый стол

- Импортзамещение: возможности сейчас и на перспективу

Фокус-сессия

- Новые вызовы в системе организации лекарственного обеспечения: спектр региональных решений

Аналитический обзор

- Судебная практика по вопросам лекарственного обеспечения

УНИКАЛЬНЫЙ СОСТАВ УЧАСТНИКОВ



СОВРЕМЕННЫЙ И ТЩАТЕЛЬНО ПРОДУМАННЫЙ ФОРМАТ ПРОВЕДЕНИЯ



- Пленарное заседание
- Секционные заседания
- Круглые столы
- Дискуссии
- Беседа в кулуарах

ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБСУЖДЕНИЕ



НОВОЕ МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ КАЗАНЬ ОТЕЛЬ «ШАЛЯПИН ПАЛАС»



Дополнительная информация
на сайте www.fru.ru,
по тел.: (495) 359-06-42, 359-53-38,
e-mail: fru@fru.ru

Обращаем Ваше внимание, что Оргкомитет конференции оставляет за собой право вносить изменения в программу и состав докладчиков



Оригинальная статья / Research article

Особенности накопления эфирного масла в траве полыни горькой флоры Воронежской области

Н. А. Дьякова✉, А. И. Сливкин, И. М. Коренская

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ВГУ), 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

✉ Контактное лицо: Дьякова Нина Алексеевна. E-mail: Ninotchka_V89@mail.ru

ORCID: Н. А. Дьякова – <https://orcid.org/0000-0002-0766-3881>; А. И. Сливкин – <https://orcid.org/0000-0001-6934-0837>; И. М. Коренская – <https://orcid.org/0000-0001-5444-8108>.

Статья поступила: 19.10.2021

Статья принята в печать: 28.03.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Травя полыни горькой (*Artemisia absinthium* L.) применяется для рефлекторного усиления секреции желудочного сока, повышения аппетита, увеличения желчеотделения. Данные фармакологические эффекты обусловлены богатым химическим составом сырья, важным компонентом которого является эфирное масло. Изучение особенностей накопления данной группы соединений является актуальным.

Цель. Цель исследования – изучение особенностей накопления эфирного масла в траве полыни горькой, заготовленной в агро- и урбоценозах Воронежской области.

Материалы и методы. В Воронежском регионе было выбрано 13 точек заготовки сырья для изучения содержания в нем эфирного масла, которое проводили по методике ФС.2.5.0033.15 «Полыни горькой трава». Для подробного изучения влияния основных поллютантов (тяжелых металлов и мышьяка) на накопление эфирного масла анализировали коэффициенты корреляции.

Результаты и обсуждение. Все проанализированное растительное сырье признано доброкачественным по содержанию эфирного масла. Максимальное количество эфирного масла (2,04 %) отмечено в образце травы полыни горькой, произрастающей на территории Хопёрского заповедника. Минимальное количество эфирного масла отмечено в образце, собранном на улице города Воронежа (0,63 %). В целом для образцов контрольных территорий и агробиоценозов можно отметить более высокое содержание эфирного масла, чем в образцах урбобиоценозов. Так, содержание эфирного масла в траве полыни горькой, собранной на территориях, лишенных хозяйственной деятельности человека, составило 1,85–2,04 %, вблизи сельскохозяйственных угодий – 1,61–1,85 %. В ряде урбанизированных территорий были заготовлены образцы травы полыни горькой с гораздо более низким содержанием эфирного масла – менее 1 % – на улице городов Воронежа, Острогожска, Борисоглебска, вдоль трассы М4 в Рамонском и Павловском районах, вдоль железной дороги. Рассчитанные значения коэффициентов корреляции показали сильное отрицательное влияние свинца, кадмия, никеля, кобальта, цинка на накопление эфирного масла в траве полыни горькой.

Заключение. Наиболее низкое содержание эфирного масла выявлено в образцах, заготовленных на улицах крупных городов области, вдоль автомобильных трасс и железной дороги. Это позволяет сделать вывод об отрицательном влиянии антропогенной нагрузки на накопление данной группы соединений в траве полыни горькой.

Ключевые слова: Воронежская область, полынь горькая, *Artemisia absinthium* L., эфирные масла, агроценозы, урбоценозы

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

Вклад авторов. А. И. Сливкин, Н. А. Дьякова придумали и разработали эксперимент. Н. А. Дьякова, И. М. Коренская провели фармакогностическое исследование и расчеты. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании статьи.

Для цитирования: Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Коренская И. М. Особенности накопления эфирного масла в траве полыни горькой флоры Воронежской области. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):140–144. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-140-144>

Features of Accumulation of Essential Oil in Bitter Wormwood Herbs of Flora of Voronezh Region of Russia

Nina A. Dyakova✉, Alexey I. Slivkin, Irina M. Korenskaya

Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394006, Russia

✉ Corresponding author: Nina A. Dyakova. E-mail: Ninotchka_V89@mail.ru

ORCID: Nina A. Dyakova – <https://orcid.org/0000-0002-0766-3881>; Alexey I. Slivkin – <https://orcid.org/0000-0001-6934-0837>; Irina M. Korenskaya – <https://orcid.org/0000-0001-5444-8108>.

Received: 19.10.2021

Revised: 28.03.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. The bitter wormwood herbs (*Artemisia absinthium* L.) is used to reflexively enhance gastric juice secretion, increase appetite, and increase bile secretion. These pharmacological effects are due to the rich chemical composition of the feedstock, of which essential oil is an important component. The study of the peculiarities of accumulation of this group of compounds is relevant.

Aim. The aim of this study the features of the accumulation of essential oil in bitter wormwood herbs, collected in agro- and urbo-cenoses of the Voronezh region.

© Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Коренская И. М., 2022

© Dyakova N. A., Slivkin A. I., Korenskaya I. M., 2022

Materials and methods. In the Voronezh region, 13 raw material harvesting points were chosen to study the content of essential oil in it, which was carried out according to the methodology of the FS "Bitter wormwood herbs." Correlation coefficients were analyzed to examine in detail the effect of basic pollutants (heavy metals and arsenic) on the accumulation of essential oil.

Results and discussion. All analyzed vegetable raw materials are considered benign in terms of essential oil content. The maximum amount of essential oil (2.04 %) is noted in a sample of bitter wormwood herbs growing on the territory of the Khopersky Reserve. The minimum amount of essential oil was noted in a sample collected on the street of the city of Voronezh (0.63 %). In general, for samples of control territories and agrobiocenoses, a higher content of essential oil can be noted than in samples of urbobiocenoses. Thus, the content of essential oil in the herb of bitter wormwood collected in territories deprived of human economic activity amounted to 1.85–2.04 %, near agricultural land – 1.61–1.85 %. In a number of urbanized territories, samples of bitter wormwood herbs with a much lower content of essential oil were harvested – less than 1 % – on the streets of the cities of Voronezh, Ostrogozhsk, Borisoglebsk, along the M4 highway in Ramonsky and Pavlovsky districts, along the railway. The calculated values of correlation coefficients showed a strong negative effect of lead, cadmium, nickel, cobalt, zinc on the accumulation of essential oil bitter wormwood herb.

Conclusion. The lowest content of essential oil was found in samples harvested on the streets of large cities of the region, along road routes and the railway. This makes it possible to conclude that the anthropogenic load has a negative effect on the accumulation of this group of compounds in bitter wormwood herbs.

Keywords: Voronezh region, bitter wormwood, essential oil, agrocenoses, urbocenoses

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. Alexey I. Slivkin, Nina A. Dyakova invented and developed the experiment. Nina A. Dyakova, Irina M. Korenskaya conducted pharmacognostic research and calculations. All authors participated in the discussion of the results and writing of the article.

For citation: Dyakova N. A., Slivkin A. I., Korenskaya I. M. Features of accumulation of essential oil in bitter wormwood herbs of flora of Voronezh region of Russia. *Drug development & registration*. 2022;11(2):140–144. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-140-144>

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к препаратам на основе растительного сырья возрастает с каждым годом. Это объясняется высокой терапевтической эффективностью таких лекарственных средств, а также, что наиболее важно, безвредностью и отсутствием побочных эффектов. При этом значительная доля заготовок лекарственных растений осуществляется в Центральной полосе России, отличающейся высокой плотностью населения, активной хозяйственной деятельностью, развитой сетью транспортных магистралей, большим количеством промышленных производств, интенсивными технологиями ведения сельского хозяйства [1–3]. В данных условиях нарастает угроза заготовки растительного сырья в экологически неблагоприятных районах, а потому актуальным становится выявление влияния антропогенного загрязнения на химический состав растений [4, 5].

Одним из видов, сырье от которого собирается от дикорастущих особей, является полынь горькая (*Artemisia absinthium* L.) – многолетнее, повсеместно встречающееся, травянистое, издревле используемое в медицине растение с выраженным желчегонным и противовоспалительным эффектом, рефлекторно усиливает секрецию желудочного сока, способствует повышению аппетита [6–9]. Широкое фармацевтическое и медицинское применение обусловлено богатым химическим составом травы полыни горькой, основу которого составляют флавоноиды и эфирное масло, а также дубильные вещества, каротин, органи-

ческие кислоты, горькие гликозиды, витамины, макро- и микроэлементы [10–13].

Известно, что в стрессовых для растения условиях обитания активизируется синтез веществ антиоксидантной активности – низкомолекулярных пептидов, органических кислот, флавоноидных соединений [14–17]. Так, ранее проведенные исследования по изучению влияния различных последствий хозяйственной деятельности человека, в частности, на накопление флавоноидов в траве полыни горькой, заготовленной в урбоценозах и агроценозах Центрального Черноземья, показали сильную вариабельность результатов: при умеренной антропогенной нагрузке отмечена индукция синтеза флавоноловых соединений, а при повышении снижение относительно других образцов сырья содержанием флавоноидов в пересчете на рутин, что можно объяснить угнетением антиоксидантной системы растения [18]. При этом анализ литературных данных о влиянии стрессовой антропогенной нагрузки на биосинтез в растениях эфирного масла показал отсутствие данных.

Цель работы – изучение особенностей накопления эфирного масла в траве полыни горькой, заготовленной в агро- и урбоценозах Воронежской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор территорий для заготовки травы полыни горькой объясняется особенностями антропогенного воздействия (таблица 1) заповедной зоны (контроль): Воронежский биосферный заповедник (1); Хопёрский

заповедник (Борисоглебский район) (2); зона, подвергшаяся радионуклидному загрязнению после аварии на Чернобыльской АЭС [город Острогожск (3)]; зоны с активной сельскохозяйственной деятельностью [Лискинский (4), Петропавловский (5), Верхнехавский (6) районы]; химическое предприятие ОАО «Минудобрения» (7); города [Борисоглебск (8); Воронеж (9)]; территории вдоль крупных дорог – трасса М4 «Дон» (10, 12), трасса А144 (11), железная дорога (13).

Изучение содержания в образцах эфирного масла – одной из основных групп биологически активных веществ в траве полыни горькой – вели по методике ФС.2.5.0033.15 «Полыни горькой трава» [19]. Взвешивание проводили на аналитических весах A&D GH-202 (AND, Япония). Каждое определение проводили трижды, полученные результаты статистически обрабатывали при доверительной вероятности 0,95.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определяемые показатели содержания эфирного масла в траве полыни горькой приведены в таблице 1.

Все проанализированное растительное сырье соответствует требованиям фармакопейной статьи по определяемому показателю [19]. Содержание эфирного масла в исследуемых образцах травы полыни горькой варьировало от 0,63 % до 2,04 %.

Максимальное количество эфирного масла (2,04 %) отмечено в образце травы полыни горькой, произрастающей на территории Хопёрского заповедника. Минимальное количество эфирного масла отмечено в образце, собранном на улице города Воронежа (0,63 %), при этом даже в этом образце содержание эфирного масла более чем в 3 раза превышает минимальный числовой показатель, приведенный в фармакопейной статье.

В целом для образцов контрольных территорий и агробиоценозов можно отметить более высокое содержание эфирного масла, чем в образцах урбобиоценозов. Так, содержание эфирного масла в траве полыни горькой, собранной на территориях, лишенных хозяйственной деятельности человека, составило 1,85–2,04 %, вблизи сельскохозяйственных угодий – 1,61–1,85 %. В ряде урбанизированных территорий были заготовлены образцы травы полыни горькой с гораздо более низким содержанием эфирного масла – менее 1 % – на улице городов Воронежа, Острогожска, Борисоглебска, вдоль трассы М4 в Рамонском и Павловском районах, вдоль железной дороги. В других изучаемых образцах, заготовленных на урбанизированных территориях, уровень содержания эфирного масла также ниже, чем в траве полыни горькой, произрастающей на контрольных территориях и в агробиоценозах.

Эфирные масла синтезируются в траве полыни горькой в эфиромасличных железках и выполняют ряд функций, главные среди которых – защита растения от различных вредителей, а также предохранение его перегрева. Эфирные масла при испарении со-

здают «защитную оболочку», уменьшающую теплопроводность для растения. Вероятно, в урбобиоценозах, ввиду малого видового разнообразия, постоянного вытаптывания, уминания растительности и прочих антропогенных воздействий, полынь горькая более подвержена влиянию солнечной радиации, а потому гораздо активнее испаряет содержащиеся в нем эфирные масла для защиты от чрезмерного перегрева. Этим можно объяснить резкое снижение содержания эфирного масла в образцах сырья, собранного на урбанизированных территориях, подвергающихся значительному антропогенному воздействию.

Таблица 1. Содержание эфирного масла в траве полыни горькой

Table 1. Content of essential oil in bitter wormwood herb

№ п/п	Территория сбора Collection area	Содержание эфирного масла, % Amount of essential oil, %
1	Воронежский государственный заповедник Voronezh State Reserve	1,85 ± 0,09
2	Хопёрский заповедник (Борисоглебский район) Khopersky Reserve (Borisoglebsky district)	2,04 ± 0,10
3	Город Острогожск Ostrogzhsk city	0,98 ± 0,08
4	Сельскохозяйственные поля Лискинского р-на Agricultural fields of the Liskinsky district	1,85 ± 0,08
5	Сельскохозяйственные поля Петропавловского р-на Agricultural fields of the Peterpaul district	1,63 ± 0,07
6	Сельскохозяйственные поля Верхнехавского р-на Agricultural fields of the Verkhnekhavsky district	1,61 ± 0,06
7	500 м от ОАО «Минудобрения» 500 m from Minudobrenia OJSC	1,40 ± 0,09
8	Город Борисоглебск Borisoglebsk city	0,79 ± 0,10
9	Город Воронеж Voronezh city	0,63 ± 0,03
10	Автомобильная трасса М4 в Рамонском р-не (0 м) Highway M4 in Ramonsky district (0 m)	0,68 ± 0,05
11	Автомобильная трасса А144 (0 м) Highway A144 (0 m)	1,03 ± 0,07
12	Автомобильная трасса М4 в Павловском р-не (0 м) Highway M4 in Pavlovsky district (0 m)	0,63 ± 0,06
13	Железная дорога (0 м) Railway (0 m)	0,68 ± 0,09
Числовой показатель по ФС [19] Numerical indicator for pharmacopoeia article		Не менее 0,2 Not less than 0.2

Для изучения влияния наиболее приоритетных загрязнителей окружающей среды – тяжелых металлов и мышьяка – на накопление эфирного масла в траве полыни горькой анализировали коэффициенты корреляции (таблица 2) [20, 21].

Таблица 2. Коэффициенты корреляции между содержанием суперэкооксидантов и эфирного масла в траве полыни горькой

Table 2. Correlation coefficients between superoxides and essential oil in bitter wormwood herbs

Элемент Element	Pb	Hg	Cd	As	Ni	Cr	Co	Cu	Zn
Коэффициент корреляции Correlation coefficient	–0,86	–0,58	–0,73	–0,51	–0,81	–0,39	–0,81	–0,67	–0,72

Рассчитанные значения коэффициентов корреляции показали, что для всех анализируемых в сырье тяжелых металлов и мышьяка [20] свойственна отрицательная корреляционная связь с содержанием эфирного масла в траве полыни горькой: сильное отрицательное влияние выявлено для свинца, кадмия, никеля, кобальта, цинка; заметное – для меди, мышьяка, ртути; умеренное – для хрома.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализировано 13 образцов травы полыни горькой, собранной в различных урбо- и агроценозах Воронежской области. В образцах определено содержание эфирного масла. Все проанализированное лекарственное растительное сырье признано доброкачественным по исследуемому показателю. Максимальное количество эфирного масла (2,04 %) отмечено в образце травы полыни горькой, произрастающей на территории Хопёрского заповедника, минимальное – в образце, собранном на улице города Воронежа (0,63 %). В целом для образцов контрольных территорий и агробиоценозов можно отметить более высокое содержание эфирного масла, чем в образцах урбобиоценозов. Рассчитанные значения коэффициентов корреляции показали сильное отрицательное влияние свинца, кадмия, никеля, кобальта, цинка на накопление эфирного масла в траве полыни горькой. Это позволяет сделать вывод об отрицательном влиянии урбанизации места заготовки на накопление эфирного масла в траве полыни горькой.

ЛИТЕРАТУРА

- Великанова Н. А. Экологическая оценка состояния лекарственного растительного сырья (на примере *Polygonum aviculare* L. и *Plantago major* L.) в урбоусловиях города Воронежа и его окрестностей. Дис. ... канд. биол. наук. Воронеж: Изд-во ВГУ; 2013. 21 с. Доступно по: <https://www.dissercat.com/content/ekologicheskaya-otsenka-sostoyaniya-lekarstvennogo-rastitelnogo-syrya>. Ссылка активна на 21.01.2022.
- Баяндин И. И., Загуская Ю. В. Взаимосвязь вторичного метаболизма и химических элементов в лекарственных растениях. *Сибирский медицинский журнал*. 2014;131(8):107–111.
- Бубенчикова В. Н., Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П. Оценка радионуклидного загрязнения лекарственного растительного сырья в Центральном Черноземье на примере травы полыни горькой. *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств*. 2019;3(25):36–44.
- Коротков И. В., Белоногова В. Д., Турышев А. Ю., Новоселова Г. Н. Качество сырья полыни горькой и душицы обыкновенной, произрастающих в пермском крае. *Фармация*. 2007;5:16–18.
- Королёв А. С., Гладышев А. А., Юткина И. С. Особенности накопления биоэлементов в надземной части *Artemisia absinthium* L. на шламовом поле криолитового завода. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2014;5(49):159–161.
- Куркин В. А. Фармакогнозия. Самара: Офорт; 2004. 1179 с.
- Гузев К. С. Ассортименты лекарственных средств и технологических приемов, которые применяли первые врачи. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;4(21):304–309.
- Бузук Г. Н., Эльяшевич Е. Г. Фармакогностическая характеристика полыни горькой *Artemisia absinthium* L. Обзор литературы. *Вестник фармации*. 2009;4(46):87–97.
- Платонов В. В., Сухих Г. Т., Волочаева М. В., Хадарцев А. А., Дунаева И. В. Химический состав органического вещества полыни горькой (*Artemisia absinthium* L., семейство сложноцветных). *Вестник новых медицинских технологий*. 2019;5:149–162.
- Северин А. П., Сипливая Л. Е., Яцюк В. Я., Чулков А. Н., Новиков О. О., Жиликова Е. Т., Кочкаров В. И. О комплексном использовании сырья полыни горькой (*Artemisia absinthium* L.) для получения фитопрепаратов. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2011;4–2(99):134–137.
- Кароматов И. Д., Каххорова С. И. К. Лекарственное растение полынь горькая – химический состав, лечебные свойства. *Биология и интегративная медицина*. 2018;9(26):84–101.
- Торыбаев Ж. С. Сравнительный анализ методик выделения биологически активных веществ на примере полыни горькой и туи западной. *Евразийское Научное Объединение*. 2020;7–3(65):146–148.
- Денисов И. В., Букатин М. В. Влияние эфирного масла полыни горькой на эмоциональный статус крыс в условиях биологического эксперимента. *Успехи современного естествознания*. 2011;8:33.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Papanga G. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996;20:933–956. DOI: 10.1002/chin.199819287.
- Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effect of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002;5:218–223. DOI: 10.1016/S1369-5266(02)00256-X.
- Loreto F., Schnitzler J. P. Abiotic stresses and induced biogenic volatile organic compounds. *Trends in Plant Science*. 2010;15:154–166. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.12.006.
- Ferdinando M. D., Brunetti C., Fini A., Tattini M. Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stresses. In: *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*. New York: Springer New York. 2012. P. 159–179. DOI: 10.1007/978-1-4614-0634-1.
- Дьякова Н. А., Гапонов С. П., Сливкин А. И., Бобина Е. А., Шишорина Л. А., Великанова Л. А. Изучение особенностей накопления флавоноидов травой полыни горькой, произрастающей в различных урбо- и агробиоценозах Воронежской области. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2020;23(7):15–21. DOI: 10.29296/25877313-2020-07-03

19. Государственная фармакопея Российской Федерации. Издание XIV. Том 4. М.: ФЭМБ; 2018. 1883 с.
20. Дьякова Н. А. Накопление тяжелых металлов и мышьяка лекарственным растительным сырьем полыни горькой. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2020;4:445–453. DOI: 10.18500/1816-9775-2020-20-4-445-453.
21. Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П. Контроль радиационной безопасности и качества лекарственного растительного сырья Воронежской области на примере корней лопуха обыкновенного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(1):73–77. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-73-77.
15. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effect of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002;5:218–223. DOI: 10.1016/S1369-5266(02)00256-X.
16. Loreto F., Schnitzler J. P. Abiotic stresses and induced biogenic volatile organic compounds. *Trends in Plant Science*. 2010;15:154–166. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.12.006.
17. Ferdinando M. D., Brunetti C., Fini A., Tattini M. Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stresses. In: *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*. New York: Springer New York. 2012. P. 159–179. DOI: 10.1007/978-1-4614-0634-1.
18. Dyakova N. A., Gaponov S. P., Slivkin A. I., Bobina E. A., Shishorina L. A., Velikanova L. A. Study of features of accumulation of flavonoids by grass of bitter pollen collected in various urban and agrobiocenoses of the Voronezh region. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2020;23(7):15–21. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2020-07-03.

REFERENCES

1. Velikanova N. A. Ecological assessment of the state of medicinal plant raw materials (using the example of *Polygonum aviculare* L. and *Plantago major* L.) in urban conditions of the city of Voronezh and its environs. [Dissertation]. Voronezh: Izd-vo VGU; 2013. 21 p. Available at: <https://www.dissercat.com/content/ekologicheskaya-otsenka-sostoyaniya-lekarstvennogo-rastitelnogo-syrya>. Accessed: 21.01.2022. (In Russ.)
2. Bayandina I. I., Zaguskaya Yu. V. The relationship of secondary metabolism and chemical elements in medicinal plants. *Siberian Medical Journal*. 2014;131(8):107–111. (In Russ.)
3. Bubenchikova V. N., D'yakova N. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P. Assessment of radio nuclide pollution of medicinal vegetable raw materials in the Central Black-soil region on the example of the grass of the sage-brush bitter. *Quality assurance of medicines*. 2019;3(25):36–44. (In Russ.)
4. Korotkov I. V., Belonogova V. D., Turyshchev A. Yu., Novoselova G. N. Quality of raw materials of common wormwood (*Artemisia absinthium*) and common origanum (*Origanum vulgare*) grown in the perm territory. *Pharmacy*. 2007;5:16–18. (In Russ.)
5. Korolyov A. S., Gladyshev A. A., Yutkina I. S. Peculiarities of bioelements accumulation in the above-ground part of *Artemisia absinthium* L. on the slime field of the cryolite plant. *News of the Orenburg State Agrarian University*. 2014;5(49):159–161. (In Russ.)
6. Kurkin V. A. Pharmacognosy. Samara: Ofort; 2004. 1179 p. (In Russ.)
7. Guzev K. S. Assortments of drugs and technological receives, which the first doctors applied. *Drug development & registration*. 2017;4(21):304–309. (In Russ.)
8. Buzuk G. N., El'yashevich E. G. Pharmacognostic characterization *Artemisia absinthium* L. Literature review. *Vestnik farmacii*. 2009;4(46):87–97. (In Russ.)
9. Platonov V. V., Suhikh G. T., Volochaeva M. V., Hadarcev A. A., Dunayeva I. V. Chemical composition of the organic matter of wormwood (*Artemisia absinthium* L., Compositae family). *Journal of New Medical Technologies*. 2019;5:149–162. (In Russ.)
10. Severin A. P., Siplivaya L. E., Yacyuk V. Ya., Chulkov A. N., Novikov O. O., Zhilyakova E. T., Kochkarov V. I. On the complex use of raw materials of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) for the production of phytopreparations. *Scientific statements of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy*. 2011;4–2(99):134–137. (In Russ.)
11. Karomatov I. D., Kahkhorova S. I. K. Herb the wormwood bitter – the chemical composition, medicinal properties. *Biologiya i integrativnaya meditsina*. 2018;9(26):84–101. (In Russ.)
12. Torybaev Zh. S. Comparative analysis of methods for isolating biologically active substances on the example of wormwood and thuja occidentalis. *Eurasian Scientific Association*. 2020;7–3(65):146–148. (In Russ.)
13. Denisov I. V., Bukatin M. V. Influence of wormwood essential oil on the emotional status of rats in a biological experiment. *Advances in current natural sciences*. 2011;8:33. (In Russ.)
14. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Papanga G. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996;20:933–956. DOI: 10.1002/chin.199819287.
15. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effect of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002;5:218–223. DOI: 10.1016/S1369-5266(02)00256-X.
16. Loreto F., Schnitzler J. P. Abiotic stresses and induced biogenic volatile organic compounds. *Trends in Plant Science*. 2010;15:154–166. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.12.006.
17. Ferdinando M. D., Brunetti C., Fini A., Tattini M. Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stresses. In: *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*. New York: Springer New York. 2012. P. 159–179. DOI: 10.1007/978-1-4614-0634-1.
18. Dyakova N. A., Gaponov S. P., Slivkin A. I., Bobina E. A., Shishorina L. A., Velikanova L. A. Study of features of accumulation of flavonoids by grass of bitter pollen collected in various urban and agrobiocenoses of the Voronezh region. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2020;23(7):15–21. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2020-07-03.
19. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Edition XIV. Volume 4. Moscow: FEMB; 2018. 1883 p. (In Russ.)
20. Dyakova N. A. Accumulation of Heavy Metals and Arsenic by Medicinal Plant Raw Material of Bitter Hollow. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*. 2020;4:445–453. (In Russ.) DOI: 10.18500/1816-9775-2020-20-4-445-453.
21. Dyakova N. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P. Control of radioactive safety and quality of medicinal vegetable raw materials of the greater burdock (*Arctium lappa* L.) roots in Voronezh region. *Drug development & registration*. 2019;8(1):73–77. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-73-77.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-145-152>
УДК 615.072



Оригинальная статья / Research article

Выбор оптимальных условий разделения куркуминоидов методом высокоэффективного капиллярного электрофореза (HPCE) с применением мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЕКС)

Д. И. Писарев^{1✉}, О. О. Новиков¹, К. С. Никитин², Н. Н. Бойко¹, К. М. Саканян³, М. Ю. Новикова⁴

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

² ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»), кафедра фармацевтической технологии, 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

³ Департамент регулирования обращения лекарственных средств и медицинских изделий Минздрава России, 127994, Россия, ГСП-4, г. Москва, Рахмановский пер, д. 3.

⁴ ЧУОО ВО «Медицинский университет «Реавиз», Московский филиал, 107564, Россия, г. Москва, ул. Краснобогатырская, д. 2, стр. 2

✉ Контактное лицо: Писарев Дмитрий Иванович. E-mail: juniper05@mail.ru

ORCID: Д. И. Писарев – <https://orcid.org/0000-0002-2996-7712>; О. О. Новиков – <https://orcid.org/0000-0003-3145-6783>; К. С. Никитин – <https://orcid.org/0000-0002-4369-9064>; Н. Н. Бойко – <https://orcid.org/0000-0001-9222-2935>; К. М. Саканян – <https://orcid.org/0000-0002-2028-2776>; М. Ю. Новикова – <https://orcid.org/0000-0002-1804-6619>.

Статья поступила: 02.06.2021

Статья принята в печать: 15.04.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Куркуминоиды являются природными полифенольными красителями, имеющими широкий спектр фармакологической активности. Для определения куркуминоидов используются как современные, так и классические методы анализа. Однако проблема анализа куркуминоидов в составе растительных и лекарственных объектов остается актуальной. Метод анализа куркуминоидов должен быть экономически доступным, но в то же время обеспечивать разделение компонентов для возможности их идентификации и количественной оценки. В настоящей работе в качестве такого метода использован капиллярный электрофорез (HPCE) в варианте мицеллярной электрокинетической хроматографии с диодно-матричным детектированием (МЕКС/DAD).

Цель. Целью настоящего анализа является выбор оптимальных условий разделения куркуминоидов с использованием капиллярного электрофореза в варианте мицеллярной электрокинетической хроматографии.

Материалы и методы. Разделение куркуминоидов проводили на приборе для капиллярного электрофореза – Agilent 7100 CE с диодно-матричным детектором и системой контроля и сбора данных Agilent ChemStation. В качестве электролита использован боратный буфер (20 mM, pH 9,3) с добавкой додецилсульфата натрия – SDS (30 mM) в соотношениях 1:1. Ввод пробы осуществлялся гидродинамическим способом – 50 мБар/3 сек, напряжение на электроде – +25 кВ, капилляр кварцевый – $L_{эфф.}/L_{общ.} = 30/40$ см, ID = 50 μ м, температура капилляра – +20 °C. Выход куркуминоидов контролировали при длине волны диодно-матричного детектора – $\lambda_{max} = 425$ нм/4 нм, реферируемая длина волны 360 нм/100 нм.

Результаты и обсуждение. Куркуминоиды в боратном буферном растворе с добавкой SDS практически не разделяются, что связано с высокой активностью электроосмотического потока, для подавления которого добавлялся спирт этиловый 95%-й. В ходе исследований установлено, что добавка спирта этилового в количестве 20 % по отношению к буферному раствору позволяет разделять смесь куркуминоидов.

Заключение. Таким образом, подобраны условия для разделения суммы куркуминоидов методом HPCE в варианте мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЕКС). Установлено, что для разделения куркуминоидов данным методом необходимо использование электролита, состоящего из смеси равных объемов боратного буфера (20 mM) и додецилсульфата натрия (30 mM) и спирта этилового в количестве 20 % от объема электролита. Дальнейшее увеличение концентрации спирта этилового в электролите нецелесообразно, поскольку может отрицательно влиять на стабильность мицелл.

Ключевые слова: куркуминоиды, капиллярный электрофорез, мицеллярная электрокинетическая хроматография, диодно-матричный детектор

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

Вклад авторов. Д. И. Писарев, О. О. Новиков разработали методику определения куркуминоидов методом капиллярного электрофореза, написали текста статьи. К. С. Никитин, Н. Н. Бойко, М. Ю. Новикова осуществляли получение сухого экстракта из корней *C. Longa* L. К. М. Саканян проводил наработку экспериментальных данных согласно разработанной методике.

Для цитирования: Писарев Д. И., Новиков О. О., Никитин К. С., Бойко Н. Н., Саканян К. М., Новикова М. Ю. Выбор оптимальных условий разделения куркуминоидов методом высокоэффективного капиллярного электрофореза (HPCE) с применением мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЕКС). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):145–152. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-145-152>

© Писарев Д. И., Новиков О. О., Никитин К. С., Бойко Н. Н., Саканян К. М., Новикова М. Ю., 2022

© Pisarev D. I., Novikov O. O., Nikitin K. S., Boyko N. N., Sakanyan K. M., Novikova M. Yu., 2022

Selection of Optimal Conditions for the Separation of Curcuminoids by High-performance Capillary Electrophoresis (HPCE) Using Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC)

Dmitry I. Pisarev¹✉, Oleg O. Novikov¹, Kirill S. Nikitin², Nikolay N. Boyko¹, Karen M. Sakanyan³, Marina Yu. Novikova⁴

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

² Belgorod National Research University, Department of Pharmaceutical Technology, 85, Pobedy str., Belgorod, 308015, Russia

³ Department for Regulation of the Circulation of Medicines and Medical Devices of the Ministry of Health of Russia, 3, Rakhmanovskiy lane, Moscow, GSP-4, 127994, Russia

⁴ Medical University "Reaviz", Moscow branch, 2/2, Krasnobogatyrskaya str., Moscow, 107564, Russia

✉ Corresponding author: Dmitry I. Pisarev. E-mail: juniper05@mail.ru

ORCID: Dmitry I. Pisarev – <https://orcid.org/0000-0002-2996-7712>; Oleg O. Novikov – <https://orcid.org/0000-0003-3145-6783>; Kirill S. Nikitin – <https://orcid.org/0000-0002-4369-9064>; Nikolay N. Boyko – <https://orcid.org/0000-0001-9222-2935>; Karen M. Sakanyan – <https://orcid.org/0000-0002-2028-2776>; Marina Yu. Novikova – <https://orcid.org/0000-0002-1804-6619>.

Received: 02.06.2021

Revised: 15.04.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. Curcuminoids are natural polyphenolic colorants with a wide spectrum of pharmacological activity. Modern hybrid and classical methods are used for the determination of curcuminoids. However, the problem of the analysis of curcuminoids in the composition of plant and medicinal objects remains relevant. In this work, capillary electrophoresis (HPCE) in the variant of micellar electrokinetic chromatography with diode array detection (MEKC/DAD) was used as such a method.

Aim. The purpose of this analysis is the choice of optimal conditions for the separation of curcuminoids using capillary electrophoresis in the form of micellar electrokinetic chromatography.

Materials and methods. Separation of curcuminoids was carried out on an Agilent 7100 CE capillary electrophoresis instrument with a diode array detector and an Agilent Chem Station monitoring and data acquisition system. Borate buffer (20 mM, pH 9.3) with the addition of sodium dodecyl sulfate – SDS (30 mM) in ratios of 1:1 was used like the electrolyte. The sample was injected hydrodynamically – 50 mbar/3 sec, electrode voltage is +25 kV, quartz capillary – total capillary length/effective capillary length = 30/40 cm, ID = 50 µm, capillary temperature +20 °C. The output of curcuminoids was monitored at the wavelength of the diode-matrix detector – $\lambda_{\text{max}} = 425 \text{ nm}/4 \text{ nm}$, the refereed wavelength is 360 nm/100 nm.

Results and discussion. Curcuminoids in a borate buffer solution with the addition of SDS are practically not separated, which is associated with a high activity of the electroosmotic flow, to suppress which 95 % ethyl alcohol was added. In the course of research, it was found that the addition of ethyl alcohol in an amount of 20 % relative to the buffer solution makes it possible to separate the mixture of curcuminoids.

Conclusion. Thus, the conditions for the separation of the total curcuminoids by the HPCE method in the variant of micellar electrokinetic chromatography (MEKC) were selected. It has been established that for the separation of curcuminoids by this method, it is necessary to use an electrolyte consisting of a mixture of equal volumes of borate buffer (20 mM) and sodium dodecylsulfate (30 mM) and ethyl alcohol in an amount of 20 % of the electrolyte volume. A further increase in the concentration of ethyl alcohol in the electrolyte is unreasonable, since it can adversely affect the stability of micelles.

Keywords: curcuminoids, capillary electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, diode-matrix detector

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. Dmitry I. Pisarev, Oleg O. Novikov – development of a method for determining curcuminoids by capillary electrophoresis, writing the text of the article. Kirill S. Nikitin, Nikolay N. Boyko, Marina Yu. Novikova – obtaining a dry extract from the roots of *C. Longa* L. Karen M. Sakanyan – accumulation of experimental data according to the developed methodology.

For citation: Pisarev D. I., Novikov O. O., Nikitin K. S., Boyko N. N., Sakanyan K. M., Novikova M. Yu. Selection of optimal conditions for the separation of curcuminoids by high-performance capillary electrophoresis (HPCE) using micellar electrokinetic chromatography (MEKC). *Drug development & registration*. 2022;11(2):145–152. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-145-152>

ВВЕДЕНИЕ

Куркуминоиды представляют собой особую группу полифенольных соединений растительного происхождения, в основе структуры которых лежит система диарилгептана. В основе диарилгептановой системы данных фенолов лежат две молекулы феруловой кислоты, связанные между собой через метиленовый мостик. Куркуминоиды включают сам куркумин и несколько его производных, в первую очередь дезметоксикуркумин и бисдезметоксикуркумин. Еноль-

ная форма куркуминоидов образует единую сопряженную хромофорную систему, следствием чего является присутствие у них ярко-желтой окраски. Поэтому куркуминоиды используются как важные пищевые и текстильные красители. Помимо пигментной роли, для куркуминоидов характерен целый ряд ценных фармакологических свойств. Описаны их антиоксидантные свойства, проявляемые за счет снижения выработки активных форм кислорода в организме вследствие поддержания деятельности ферментов-антиоксидантов, таких как супероксиддисму-

таза, каталаза и глутатионпероксидаза. Также куркуминоиды *in vivo* оказывают онкопротекторное действие посредством индукции апоптоза и ингибирования клеточного цикла. Описано гипохолестеринемическое действие куркуминоидов путем снижения уровня холестерина и ЛПНП в крови. Также куркуминоиды стимулирует выработку желчи и проявляют гастропротекторное действие, увеличивая секрецию муцина в желудке. Кроме вышеперечисленного, куркуминоиды снижают резистентность организма к глюकोзе, тем самым улучшая углеводный обмен [1–3].

Анализ куркуминоидов, а именно их разделение и определение в составе растительных объектов, пищевых продуктов и лекарственных препаратов, представляет собой довольно сложную задачу, поскольку данные компоненты близки по химическому составу и плохо разделяются в условиях различных вариантов хроматографического анализа, что затрудняет их анализ по отдельности.

Для их определения в различных объектах предложен целый ряд современных и классических методов анализа. В числе современных методов, в первую очередь следует упомянуть высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) [4–6] с различными вариантами детектирования: масс-спектрометрическим (MS), диодно-матричным (DAD). Среди классических вариантов исследования использовались ИК-спектроскопия с Фурье-преобразованием (FTIR) [7], УФ-спектроскопия (UV spectroscopy) [8], ядерный магнитный резонанс (NMR) [9] и высокоэффективная тонкослойная хроматография (HPTLC) [10].

Таким образом, современные хроматографические методы, в первую очередь ВЭЖХ, позволяют определять куркуминоиды по отдельности, однако требуют сложного, дорогостоящего, малодоступного оборудования. Спектральные методы больше подходят для количественного определения суммы куркуминоидов, но не годятся для определения отдельных компонентов.

Таким образом, проблема анализа куркуминоидов в составе растительных и лекарственных объектов остается актуальной. Метод анализа куркуминоидов должен быть экономически доступным, но в то же время обеспечивать разделение компонентов для возможности их идентификации и количественной оценки. Нами в качестве такого альтернативного высокоэффективной жидкостной хроматографии метода использован капиллярный электрофорез (HPCE) в варианте мицеллярной электрокинетической хроматографии с диодно-матричным детектированием (МЕКС/DAD).

В этой связи **целью** настоящего анализа является выбор оптимальных условий разделения куркуминоидов с использованием капиллярного электрофореза в варианте мицеллярной электрокинетической хроматографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта анализа использован сухой экстракт из корневищ куркумы длинной – *Curcuma longa* L., – полученный по традиционной технологии изготовления сухих экстрактов, методом перколяции. Сырье – высушенные, измельченные корневища куркумы (страна произрастания – Уганда, год сбора 2020). Разделение куркуминоидов проводили на приборе – Agilent 7100 CE, состоящем из блока для капиллярного электрофореза со встроенным диодно-матричным детектором (диапазон 190–600 нм) и системой контроля и сбора данных Agilent ChemStation. В качестве буферного раствора использовали боратный буфер с концентрацией 20 мМ и pH 9,3. Для изготовления боратного буфера использовали натрия тетраборат (CAS № 1330-43-4, 99,5 %, Sigma Aldrich, США). Непосредственно перед анализом капилляр предварительно подвергали циклу кондиционирования, состоящему из промывки 0,1 М натрия гидроксидом в течение 5 минут, затем водой в течение 5 минут и далее боратным буферным раствором – 5 минут.

Полученный сухой экстракт из корневищ куркумы в количестве 0,1 г помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 10 мл спирта этилового 95%-го, встряхивали и обрабатывали ультразвуком на ультразвуковой бане при комнатной температуре 3 минуты до полного растворения порошка. Полученный раствор доводили до метки тем же растворителем и перемешивали. Непосредственно перед анализом полученный раствор фильтровали с помощью шприцевого фильтра Acrodisc CR PTFE с нейлоновой мембраной и размером пор 0,45 мкм.

Анализируемый раствор помещали в вials из полипропилена объемом 100 мкл. Ввод пробы осуществлялся гидродинамическим способом – 50 мбар/3 сек.

Характеристики блока питания устанавливали в пределах:

- напряжение на электроде +25 кВ;
- максимальная сила тока 300 мкА;
- мощность 6 Вт.

Определение проводили при температуре капилляра – 20 °С. В качестве рабочего использован кварцевый капилляр – $L_{\text{эфф.}}/L_{\text{общ.}} = 40 \text{ см}, ID = 50 \text{ }\mu\text{м}$.

Выход куркуминоидов контролировали при длине волны их поглощения – $\lambda_{\text{max}} = 425 \text{ нм}/4 \text{ нм}$, референсная длина волны 360 нм/100 нм.

Длина волны детектирования выбрана в соответствии с УФ-спектром куркуминоидов, которые в боратном буфере имеют два основных максимума поглощения при $\lambda_{\text{max}} = 260$ и 425 нм, при этом более специфичным является максимум при 425 нм.

Поскольку куркуминоиды представляют собой нейтральные молекулы, то для их определения использован вариант капиллярного электрофореза, предназначенный для анализа таких молекул – мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЕКС)

с добавлением анионноактивного ПАВ – додецилсульфата натрия (SDS) (CAS № 151-21-3, 99,0 %, Sigma Aldrich, США). SDS был добавлен в концентрации 30 мМ к боратному буферному раствору в соотношениях 1:1. Поэтому далее в качестве электролита использовали данную систему.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении электрофореза в описанных выше условиях обнаруживался один пик со временем миграции – 11,789 мин (рисунок 1), имеющий типичный максимум поглощения, характерный для куркуминоидов – 425 нм. Электрофоретические параметры определения куркуминоидов в системе боратный буфер – SDS представлены в таблице 1.

Как видно на приведенной электрофореграмме, при проведении электрофореза суммы куркуминоидов в системе боратный буфер – SDS наблюдается один пик со временем миграции 11,798 мин. Присутствие одного пика на электрофореграмме свидетельствует о том, что сумма куркуминоидов в приведенных условиях не разделяется. Такое явление может быть связано со слишком активным электрокинетическим потоком, происходящим в системе, поэтому компоненты суммы не успевают разделиться.

Для уменьшения электрокинетического потока в буферную систему добавлялся спирт этиловый 95%-й в разных соотношениях по отношению к буферу.

При добавлении спирта этилового 95%-го в количестве 5 % к буферной системе также наблюдался один пик, т. е. разделения куркуминоидов опять не произошло, однако электрофоретические параметры улучшились, возросла площадь пика, число теоретических тарелок и симметрия пика, но вместе с тем, как и ожидалось, время миграции также возросло (рисунок 2, таблица 2).

При дальнейшем увеличении концентрации спирта этилового в буферной системе электрофоретический профиль анализируемой суммы куркуминоидов изменился. Добавка в буферный раствор 10 % спирта этилового спровоцировала небольшое разделение суммы куркуминоидов (рисунок 3, таблица 3).

При дальнейшем увеличении концентрации спирта этилового до 20 % в буферной системе удалось полностью разделить сумму куркуминоидов (рисунок 4, таблица 4).

На представленной электрофореграмме обнаруживаются 3 компонента, вещество со временем миграции 22, 917 принадлежит куркумину, остальные два – дезметоксикуркумину и бисдезметоксикуркумину.

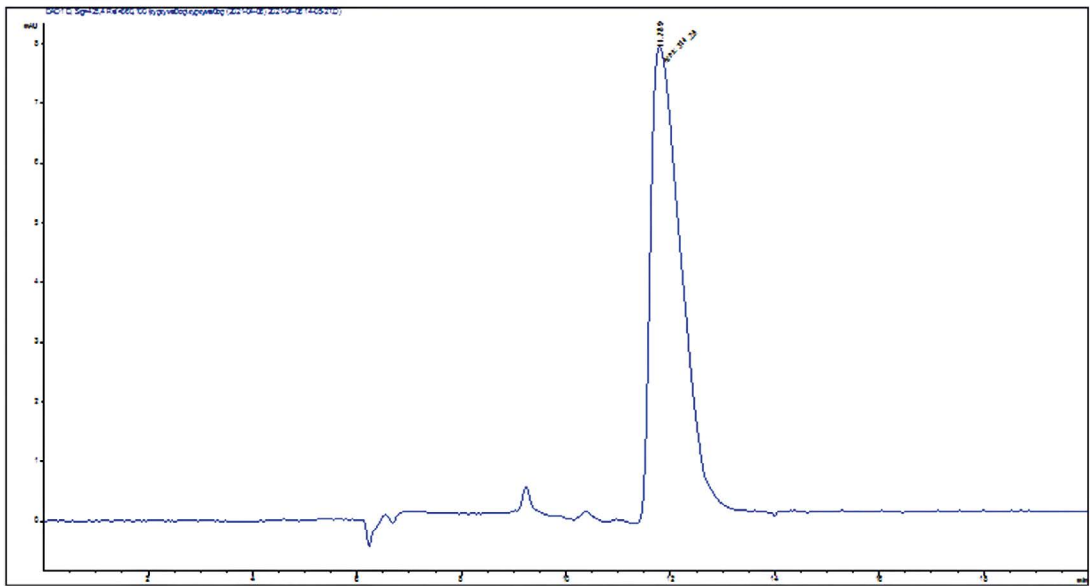


Рисунок 1. Электрофореграмма суммы куркуминоидов, полученная в боратном буфере с добавлением SDS (1:1)
Figure 1. Electropherogram of the total curcuminoids obtained in borate buffer with the addition of SDS (1:1)

Таблица 1. Электрофоретические параметры определения куркуминоидов в системе боратный буфер – SDS
Table 1. Electrophoretic parameters for the determination of curcuminoids in the borate buffer – SDS system

MigTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Signal ution /Noise
11.798	-	323.07010	7.92571	0.40	0.6664	1736	-	-

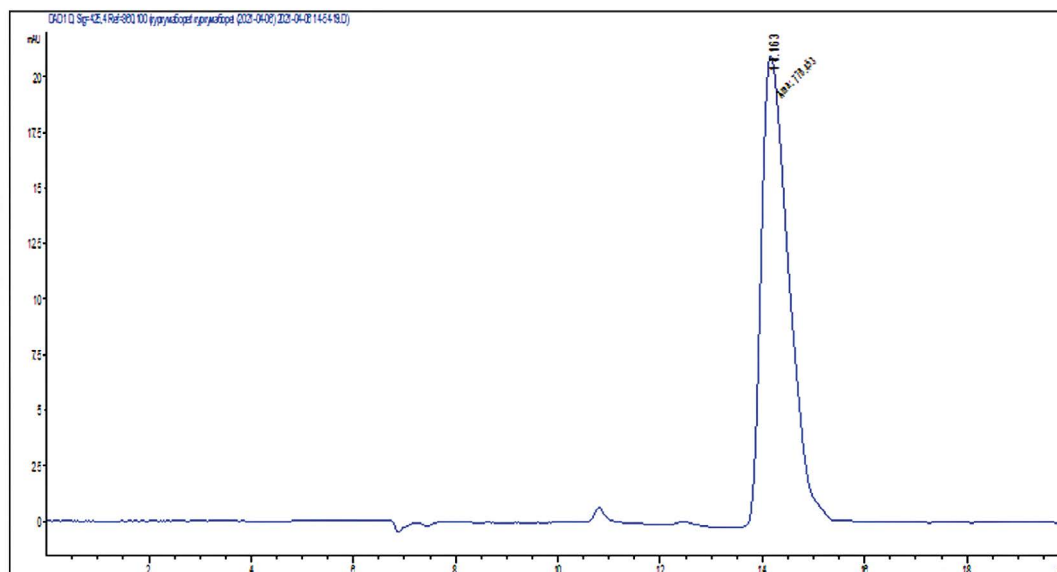


Рисунок 2. Электрофореграмма суммы куркуминоидов, полученная в системе боратный буфер – SDS (1:1) с добавлением 5 % спирта этилового

Figure 2. Electropherogram of the total curcuminoids obtained in the system borate buffer – SDS (1:1) with the addition of 5 % ethyl alcohol

Таблица 2. Электрофоретические параметры определения куркуминоидов в системе боратный буфер – SDS с добавлением 5 % спирта этилового

Table 2. Electrophoretic parameters for the determination of curcuminoids in the borate buffer – SDS system with the addition of 5 % ethyl alcohol

MigTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Signal ution /Noise
14.163	-	781.32983	21.10640	0.50	0.5770	3338	-	-

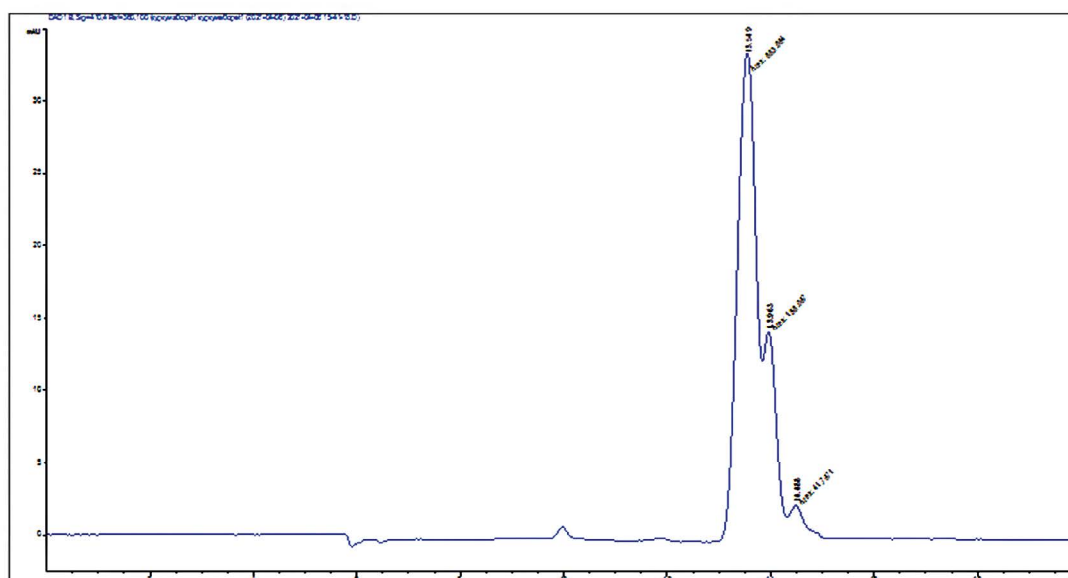


Рисунок 3. Электрофореграмма суммы куркуминоидов, полученная в системе боратный буфер – SDS (1:1) с добавлением 10 % спирта этилового

Figure 3. Electropherogram of the total curcuminoids obtained in the system borate buffer – SDS (1:1) with the addition of 10 % ethyl alcohol

Таблица 3. Электрофоретические параметры определения куркуминоидов в системе боратный буфер – SDS с добавлением 10 % спирта этилового

Table 3. Electrophoretic parameters for the determination of curcuminoids in the borate buffer – SDS system with the addition of 10 % ethyl alcohol

MigTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Signal /Noise
13.549	-	883.06415	33.57510	0.98	0.4089	6084	-	-
13.963	-	158.06660	14.36367	0.05	0.1717	36634	0.84	-
14.488	-	41.76710	2.43035	0.99	0.3371	10236	1.21	-

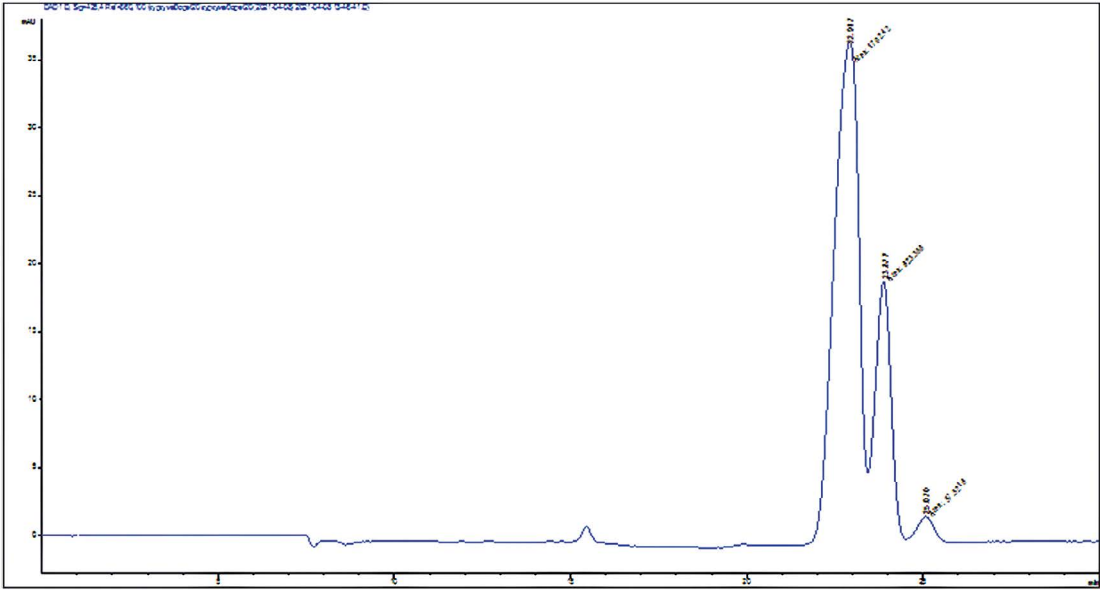


Рисунок 4. Электрофореграмма суммы куркуминоидов, полученная в системе боратный буфер – SDS (1:1) с добавлением 20 % спирта этилового

Figure 4. Electropherogram of the total curcuminoids obtained in the system borate buffer – SDS (1:1) with the addition of 20 % ethyl alcohol

Таблица 4. Электрофоретические параметры определения куркуминоидов в системе боратный буфер – SDS с добавлением 20 % спирта этилового

Table 4. Electrophoretic parameters for the determination of curcuminoids in the borate buffer – SDS system with the addition of 20 % ethyl alcohol

MigTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Signal /Noise
22.917	-	1792.42163	36.92974	1.64	0.7900	4662	-	-
23.877	-	623.38806	19.34296	1.13	0.5133	11986	0.87	-
25.070	-	57.52157	1.79319	1.04	0.5200	12877	1.36	-

УФ-профили обнаруженных куркуминоидов представлены на рисунке 5.

Влияние увеличения концентрации спирта этилового на некоторые электрофоретические параметры представлено на рисунке 6.

Увеличение концентрации спирта этилового в использованной буферной системе также привело к улучшению коэффициента разделения компонентов.

При этом в концентрации 5 % разделения суммы куркуминоидов не наблюдалось, однако уже 10%-ая концентрация позволила частично разделить анализируемую смесь на составляющие. 20%-ая концентрация спирта этилового в электролите вызвала еще большее увеличение коэффициентов разделения до значений, позволяющих проводить количественную оценку каждого из компонентов.

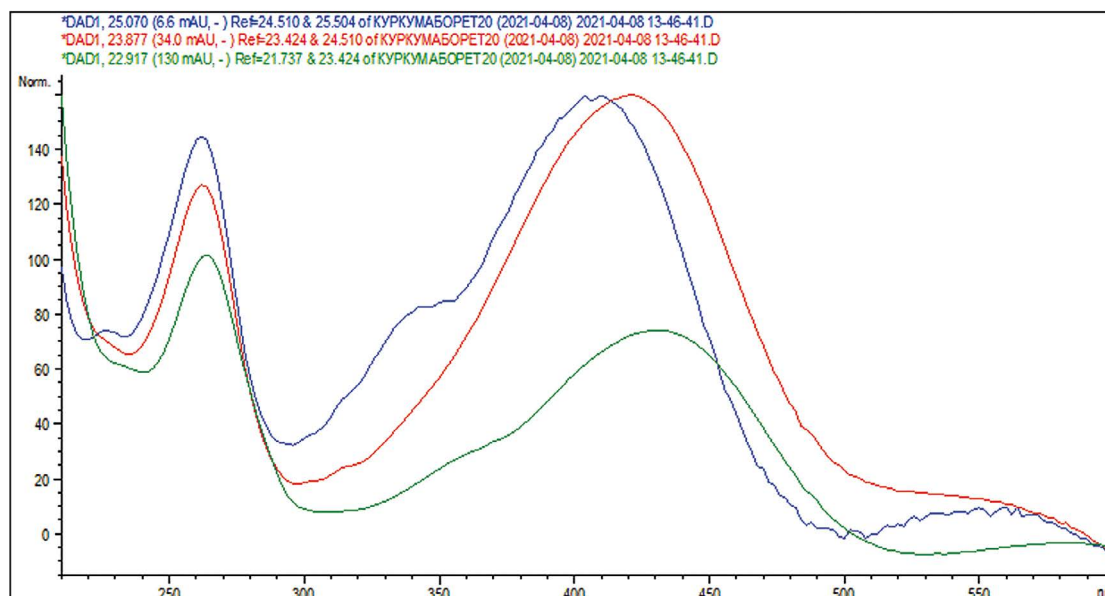
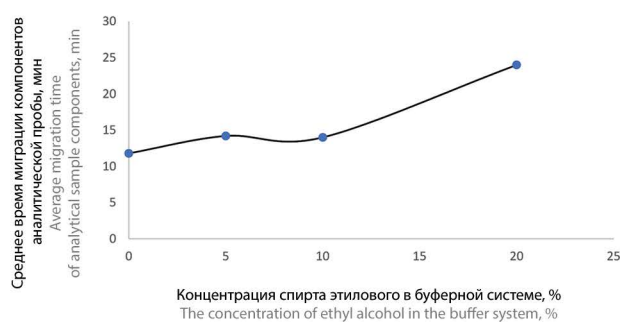
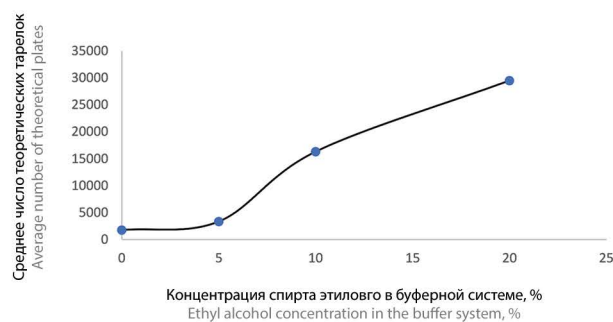


Рисунок 5. УФ-профили компонентов суммы куркуминоидов

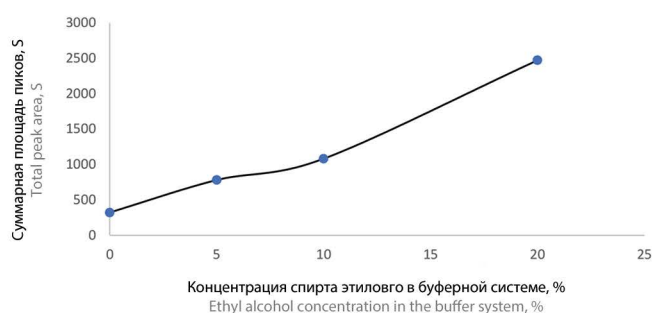
Figure 5. UV profiles of components of the sum of curcuminoids



Зависимость среднего времени миграции компонентов аналитической пробы от концентрации спирта этилового
Dependence of the average migration time of the components of the analytical sample on the concentration of ethyl alcohol



Зависимость среднего числа теоретических тарелок от концентрации спирта этилового
Dependence of the average number of theoretical plates on the concentration of ethyl alcohol



Зависимость суммарной площади пиков компонентов аналитической пробы от концентрации спирта этилового
The dependence of the total area of the peaks of the components of the analytical sample on the concentration of ethyl alcohol

Рисунок 6. Влияние увеличения концентрации спирта этилового на некоторые электрофоретические параметры, определяемой суммы куркуминоидов

Figure 6. The effect of an increase in the concentration of ethyl alcohol on some electrophoretic parameters, determined by the sum of curcuminoids

Дальнейшее увеличение концентрации спирта этилового в электролите существенно не изменяет электрофоретических параметров за исключением времени миграции.

Следовательно, можно утверждать, что добавка спирта этилового к боратному буферному раствору с SDS не только способствует разделению компонентов суммы, но улучшает большинство электрофоретических параметров, исключая времени миграции. Улучшение электрофоретических параметров с увеличением концентрации спирта этилового в электролите можно объяснить уменьшением степени сорбции куркуминоидов на стенках капилляра и замедлением электрокинетического потока. При этом данный растворитель способствует вымыванию куркуминоидов со стенок капилляра и улучшает их растворимость в электролите.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, подобраны условия для разделения суммы куркуминоидов методом НРСЕ в варианте мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЕКС). Установлено, что для разделения куркуминоидов данным методом необходимо использование электролита, состоящего из смеси равных объемов боратного буфера (20 mM) и додецилсульфата натрия (30 mM) и спирта этилового в количестве 20 % от объема электролита. Кроме того, увеличение концентрации спирта этилового улучшает большинство электрофоретических параметров – число теоретических тарелок, площадь и симметрию пика, коэффициенты разделения, однако отрицательно влияет на время миграции компонентов, что вызвано снижением скорости электрокинетического потока. Дальнейшее увеличение концентрации спирта этилового в электролите нецелесообразно, поскольку увеличение его содержания в электролите может отрицательно влиять на стабильность мицелл.

Поскольку разработанная методика позволяет разделять и идентифицировать куркуминоиды, то на следующем этапе настоящих исследований будет адаптация полученных результатов для цели количественного определения индивидуальных куркуминоидов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ashraf K., Sultan S. A comprehensive review on Curcuma longa Linn.: Phytochemical, pharmacological, and molecular study. *International Journal of Green Pharmacy*. 2017;11(4):671–685. DOI: 10.22377/ijgp.v11i04.1343.
2. Tanvir E. M., Sakib H., Fuad H., Rizwana A., Hua G. S., Ibrahim K., Nurul K. Antioxidant properties of popular Turmeric (Curcuma longa) varieties from Bangladesh. *Journal of food quality*. 2017;1–8. DOI: 10.1155/2017/8471785.
3. Verma R. K., Kumari P., Maurya R. K., Kumar V., Kumar Singh R. Medicinal properties of turmeric (Curcuma longa L.). *International journal of chemical studies*. 2018;6(4):1354–1357.
4. Nishidono Y., Chiyomatsu T., Saifudin A., Deevanhxay P., Nanaoka K. Comparative study on the chemical constituents of Curcuma drugs. *Journal of the Asia-Japan research institute of ritsumeikan university*. 2020;2:15–33.
5. Zhimin C., Yongfeng Z., Liang Q., Haiting Z., Dong C., Changjiang H., Wenbing L., Zhuo Y. Study on quality standard of processed Curcuma longa radix. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2017;1–6. DOI: 10.1155/2017/2830754.
6. Jin S., Song C., Jia S., Li S., Zhang Y., Chen C., Feng Y., Xu Y., Xiong C., Xiang Y., Jiang H. An integrated strategy for establishment of curcuminoid profile in turmeric using two LC-MS/MS platforms. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2017;132:93–102. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.09.039.
7. Siregar C., Martono S., Rohman A. Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy coupled with multivariate calibration for quantitative analysis of curcuminoid in tablet dosage form. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2018; 8(08):151–156. DOI: 10.7324/JAPS.2018.8821.
8. Singh A., Avupati V. R. Development and Validation of UV-Spectrophotometric method for the Estimation of Curcumin in Standardised Polyherbal Formulations. *Journal of Young Pharmacists*. 2017;9(4):491–495. DOI: 10.5530/jyp.2017.9.96.
9. Hadi S., Artanti A. N., Rinanto Y., Wahyuni D. S. C. Curcuminoid content of Curcuma longa L. and Curcuma xanthorrhiza rhizome based on drying method with NMR and HPLC-UV. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2018;349:012058. DOI: 10.1088/1757-899X/349/1/012058.
10. Kharat S., Namdeo A., Mehta P. Development and validation of HPTLC method for simultaneous estimation of curcumin and galangin in polyherbal capsule dosage form. *Journal of Taibah University for Science*. 2017;11(5):775–781. DOI: 10.1016/j.jtusci.2016.10.004.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-153-158>
УДК 614.35; 615.013



Оригинальная статья / Research article

Гигиенический мониторинг загрязненности воздуха рабочей зоны твердыми частицами тикагрелора на фармацевтическом предприятии

И. А. Пожарнов¹, А. С. Симаков¹, Н. А. Шульга¹✉, А. Ю. Савченко², О. И. Передеряев¹, Л. С. Сынова^{1,3}, Ю. В. Медведев^{1,3}, Е. Н. Фишер^{1,3}

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 «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ), 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

³ ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

✉ Контактное лицо: Шульга Николай Андреевич. E-mail: shulga_n_a@student.sechenov.ru

ORCID: И. А. Пожарнов – <https://orcid.org/0000-0002-5721-1883>; А. С. Симаков – <https://orcid.org/0000-0002-3076-0030>; Н. А. Шульга – <https://orcid.org/0000-0001-8717-6161>;

А. Ю. Савченко – <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>; О. И. Передеряев – <https://orcid.org/0000-0003-4273-4355>;

Л. С. Сынова – <https://orcid.org/0000-0002-1844-1344>; Ю. В. Медведев – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>; Е. Н. Фишер – <https://orcid.org/0000-0002-6456-7669>.

Статья поступила: 25.02.2022

Статья принята в печать: 13.05.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Гигиенический мониторинг загрязненности воздуха на фармацевтическом предприятии является обязательным требованием законодательства Российской Федерации (приказов, стандартов, методических указаний и руководств). Данное требование следует из необходимости защиты персонала фармацевтического предприятия от воздействия неблагоприятных условий воздушной среды рабочей зоны, в которой могут находиться взвешенные твердые частицы активных фармацевтических субстанций (АФС). Несмотря на использование персоналом средств индивидуальной защиты органов дыхания и соблюдение требований охраны труда, риск для работников должен быть сведен к минимуму за счет регулярной оценки степени загрязнения воздуха.

Цель. Целью работы является проведение гигиенического мониторинга воздуха рабочей зоны тикагрелора – АФС лекарственного препарата Брилинта®.

Материалы и методы. Объектом данного исследования является АФС тикагрелор, а именно: образцы воздуха и смывы с поверхности предприятия ООО «АстраЗенка Индастриз», отобранные во время производства партий препарата Брилинта® (МНН – тикагрелор). Пробоотбор воздуха рабочей зоны проводился с использованием систем забора воздуха типа «IOM Sampler» с использованием как персональных, так и стационарных систем. Смывы с поверхности проводились трафаретным методом с использованием хлопковых свабов. Выбор точек для отбора проб осуществлялся таким образом, чтобы охватить все стадии технологического цикла производства. Впоследствии количественное определение тикагрелора в образцах проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ детектированием (ВЭЖХ-УФ).

Результаты и обсуждения. При анализе количественного содержания тикагрелора в образцах были обнаружены 4 пробы воздуха и 25 смывов с поверхности с превышением допустимого содержания тикагрелора. Каждая проба была соотнесена с временем и местом ее отбора, были проанализированы возможные причины превышения нормативных значений в точках отбора проб.

Заключение. На фармацевтическом предприятии был проведен гигиенический мониторинг воздуха рабочей зоны на содержание АФС тикагрелора. Были получены и обработаны результаты измерений, на основании которых были предложены меры снижения концентрации тикагрелора в воздухе, необходимые для защиты персонала от неблагоприятного воздействия рабочей зоны. Данные меры включают в себя оптимизацию технологических операции и/или обучение персонала новым подходам к эксплуатации и очистке оборудования.

Ключевые слова: гигиенический мониторинг, воздух рабочей зоны, тикагрелор, ВЭЖХ-УФ

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 Н. А. Шульга провели сбор и анализ материала, подготовили текст статьи. А. Ю. Савченко и О. И. Передеряев выполняли общее руководство, научное консультирование и редактирование статьи. Л. С. Сынова, Ю. В. Медведев, Е. Н. Фишер проводили количественное определение тикагрелора в пробах.

Для цитирования: Пожарнов И. А., Симаков А. С., Шульга Н. А., Савченко А. Ю., Передеряев О. И., Сынова Л. С., Медведев Ю. В., Фишер Е. Н. Гигиенический мониторинг загрязненности воздуха рабочей зоны твердыми частицами тикагрелора на фармацевтическом предприятии. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(2):153–158. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-153-158>

Hygienic Monitoring of Working Area Air Pollution by Particulate Matter of ticagrelator in the Pharmaceutical Factory

Igor A. Pozharnov¹, Alexey S. Simakov¹, Nikolay A. Shulga¹✉, Alla Yu. Savchenko², Oleg I. Perederyaev¹, Lydia S. Synkova^{1,3}, Yuriy V. Medvedev^{1,3}, Elizaveta N. Fisher^{1,3}

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 National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia

³ LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

✉ Corresponding author: Nikolay A. Shulga. E-mail: shulga_n_a@student.sechenov.ru

© Пожарнов И. А., Симаков А. С., Шульга Н. А., Савченко А. Ю., Передеряев О. И., Сынова Л. С., Медведев Ю. В., Фишер Е. Н., 2022

© Pozharnov I. A., Simakov A. S., Shulga N. A., Savchenko A. Yu., Perederyaev O. I., Synkova L. S., Medvedev Yu. V., Fisher E. N., 2022

ORCID: Igor A. Pozharnov – <https://orcid.org/0000-0002-5721-1883>; Alexey S. Simakov – <https://orcid.org/0000-0002-3076-0030>; Nikolay A. Shulga – <https://orcid.org/0000-0001-8717-6161>; Alla Yu. Savchenko – <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>; Oleg I. Perederyaev – <https://orcid.org/0000-0003-4273-4355>; Lydia S. Synkova – <https://orcid.org/0000-0002-1844-1344>; Yuriy V. Medvedev – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>; Elizaveta H. Fisher – <https://orcid.org/0000-0002-6456-7669>.

Received: 25.02.2022 Revised: 13.05.2022 Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. Hygienic monitoring of air pollution at the pharmaceutical enterprise required by the law of the Russian Federation (orders, standards, methodological guidelines and guidelines). This requirement follows from the need to protect the personnel of the pharmaceutical plant from the adverse air conditions of the working area, which may contain suspended solids of active pharmaceutical ingredient (API). Despite the use of breathing equipment by staff and occupational safety requirements, the risk to workers should be minimized by regular assessment of air pollution.

Aim. The purpose of the study is to carry out hygienic monitoring of working area air ticagrelor – API of the medicinal preparation Brilinta®.

Materials and methods. The subject of this research is API ticagrelor including air and flush samples from the surface of LLC «AstraZenica Industries», collected during the production of the consignment of Brilinta® (MNN – ticagrelor). Air samples of the working area were collected using air intake systems of type "IOM Sampler", using both personal and stationary systems. Flushing from the surface is done by template v printing using cotton swaps. Sampling points selected to cover. All stages of the production cycle. Subsequently, the quantification of ticagrelor in samples was carried out by the method of high-efficiency liquid chromatography with UV detection (HPLC-UV).

Results and discussions. The quantitative determination showed that 4 air samples and 25 surface fluxes exceeding the allowable content of ticagrelor. Each sample was related to the time and place of sampling, and assumptions were made as to why the sample points exceeded the standard values.

Conclusion. At the pharmaceutical enterprise we have carried out hygienic monitoring of the working area air for the content of API ticagrelor. The results of the measurements were obtained and processed, on the basis of which measures were proposed to reduce the concentration of ticagrelor in the air in order to protect personnel from the adverse effects of the work area. These measures include optimization of process operations and/or training of personnel in new approaches to the operation and cleaning of equipment.

Keywords: hygienic monitoring, working area air, ticagrelor

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 Nikolay A. Shulga collected and analyzed the material, prepared the text of the article. Alla Yu. Savchenko and Oleg I. Perederyaev performed general guidance, scientific consulting and editing of the article. Lydia S. Synkova, Yuriy V. Medvedev, Elizaveta N. Fisher carried out the quantitative determination of ticagrelor in samples.

For citation: Pozharnov I. A., Simakov A. S., Shulga N. A., Savchenko A. Yu., Perederyaev O. I., Synkova L. S., Medvedev Yu. V., Fisher E. N. Hygienic monitoring of working area air pollution by particulate matter of ticagrelor in the pharmaceutical factory. *Drug development & registration*. 2022;11(2):153–158. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-153-158>

ВВЕДЕНИЕ

Определение степени загрязненности воздуха на фармацевтическом предприятии является важной частью охраны здоровья персонала от воздействия нежелательных фармакологических и побочных эффектов активной фармацевтической субстанции (АФС) [1, 2]. Твердые частицы активной фармацевтической субстанции, находящиеся во взвешенном состоянии в воздухе рабочей зоны, представляют собой аэрозоль – дисперсную систему, в которой дисперсной фазой являются частицы, а дисперсионной средой – воздух. Свойства взвешенных частиц, такие как дисперсность и электрозаряженность, влияют на продолжительность нахождения частиц в воздухе, так, например, высокодисперсные системы более стабильны и сохраняются в рабочей зоне дольше [3]. Дисперсность системы также определяет удельную площадь взвешенных частиц, что влияет на степень воздействия аэрозоля на персонал предприятия: скорость и процент абсорбции, отдел дыхательных путей, в котором оседают частицы [4–6].

Источниками возникновения взвешенных частиц могут быть любые технологические процессы, в которых участвует АФС [7]. Стоит отметить, что концентрация взвешенных частиц в воздухе рабочей зоны не является постоянной, а может изменяться во времени в зависимости от текущей технологической операции или состояния оборудования [3]. Для оценки и контроля риска вредного воздействия на персонал целесообразно проводить гигиенический мониторинг воздуха рабочей зоны в производственных помещениях [8].

В соответствии с законодательством Российской Федерации основным критерием загрязненности воздуха является предельно допустимая концентрация веществ в воздухе рабочей зоны (ПДКрз), а в случае его отсутствия утверждается временный норматив – ориентировочный безопасный уровень воздействия (ОБУВ) вредных веществ в воздухе рабочей зоны. Нормы ПДК и ОБУВ устанавливаются на основании данных о токсикологических и физико-химических свойствах вещества [9]. Нормативы ПДКрз утверждены главным санитарным врачом Российской Федера-

ции (СанПиН 1.2.3685-21). Особенности гигиенической оценки содержания АФС изложены в методических указаниях (МУ 1.1.726-98).

Гигиенический мониторинг загрязнения воздуха состоит из двух взаимосвязанных частей, а именно: пробоотбора и анализа проб. Пробоотбор представляет собой отбор анализируемого вещества в рабочей зоне из известного объема воздуха или с поверхности известной площади и его сохранение на носителе. Важной частью пробоотбора является установление временных и пространственных точек отбора пробы. Особое внимание следует уделять источнику загрязнения – технологическому оборудованию, оказывающему воздействие на человека в непосредственной его близости¹. Анализ проб проводился методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием, в рамках которого определялось количественное содержание контролируемой АФС тикагрелора.

Целью данного исследования является проведение гигиенического мониторинга воздуха рабочей зоны тикагрелора, позволяющего оценить уровень загрязненности воздуха взвешенными частицами АФС и сделать вывод о безопасности технологических процессов производства. Методика проведения соответствует Руководству по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса² и ГОСТ 12.1.005-88³.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования является АФС тикагрелор, входящая в состав лекарственного препарата Брилинта®. Тикагрелор – антиагрегантный препарат, обратимо предотвращает АДФ-опосредованную активацию и агрегацию тромбоцитов [10, 11]. Умеренно опасное вещество при поступлении внутрь, обладает функциональной кумулятивной активностью, оказывает влияние на систему гемостаза, функцию печени и почек [12]. Наиболее распространенная побочная реакция – кровотечение в различных системах органов [13].

Данное исследование было совершено во время производства установочных серий продукта Брилинта® на базе производственного предприятия ООО «АстраЗенека Индастриз».

Для отбора проб воздуха был использован пробоотборник типа «IOM Sampler»; мембранный фильтр PBX Millipore, диаметр пор – 5 мкм, диаметр – 25 мм

¹ ISO 16000-1:2004. Indoor air – Part 1: General aspects of sampling strategy. Available at: <https://www.iso.org/standard/39844.html>. Accessed: 23.02.2022.

² Р 2.2.2006-05. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда. Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/1200040973>. Ссылка активна на 23.02.2022.

³ ГОСТ 12.1.005-88. ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны. Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/1200003608>. Ссылка активна на 23.02.2022.

(Merck KGaA, Германия); индивидуальный насос GilAir Plus (Sensidyne, LP, США), скорость потока воздуха – 2000 мл/мин.

Калибровка насосов осуществлялась с помощью первичного калибратора Defender 520 (Bios International Corporation, США). Предварительная и последующая калибровки проводились в начале и в конце рабочего дня.

Отбор проб воздуха проводился на каждом технологическом процессе и длился на протяжении всего процесса. Для этого использовались как персональные пробы, размещенные на операторах, потенциально наиболее подверженных воздействию тикагрелора в воздухе, так и стационарные пробы, находящиеся в определенной части рабочей зоны, для оценки возможных источников загрязнения. Собранные фильтры для отбора проб были помещены в специальные клипсы с номером пробы, а после в «зип-лок» пакеты.

Смывы с поверхности проводились свабами (материал – хлопок, Deltalab, Испания), смоченными в этаноле, с использованием трафарета площадью 100 см². Пробоотбор производился в конце смены или в конце технологического процесса. Выбор места для смыва осуществлялся в зависимости от распространения тикагрелора и практики работы сотрудников, смывы также отбирали со средств индивидуальной защиты органов дыхания (СИЗОД) и рук персонала. После пробоотбора сваб закрывался в пластиковой пробирке с номером, соответствующим пробе.

Все пробы были задокументированы, во время отбора проб производилась фотосъемка для последующей правильной интерпретации результатов анализа. Записи включали в себя: дату измерения, количество, время начала и время конца отбора проб, название технологического процесса, имя оператора, на котором установлена персональная проба или, в случае стационарной пробы, подробное описание места установки устройства для пробоотбора, а также наблюдения за действиями операторов, повлекшие за собой возможное увеличение содержания вредных веществ в воздухе рабочей зоны.

После завершения мониторинга отобранные образцы проб были отправлены в аналитическую лабораторию, где проводится их анализ по методике, описанной в МУК 4.1.3426-17.

Оборудование

Высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, США) с УФ-детектором (VWD-детектором).

Весы A&D GR-200 (A&D Company Ltd., Япония).

pH-метр-милливольтметр pH-420.

Ванна ультразвуковая 5DT (Stegler, Китай).

Дозатор пипеточный одноканальный переменного объема «Техно» 500–5000 мкл.

Дозатор пипеточный одноканальный переменного объема «Техно» 100–1000 мкл.

Реактивы

Ацетонитрил (Reag. Ph. Eur.) for UHPLC Supergradient, ACS (PanReac AppliChem).

Натрия дигидрофосфат дигидрат, 98+ %, for analysis (Acros Organics, Бельгия).

Ortho-Phosphoric Acid 85 % (USP-NF, BP, Ph. Eur.) pure, pharma grade (PanReac AppliChem).

Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72.

Вода особо чистая, ТУ 6-09-2502-77.

Хроматографические условия

Колонка – ZORBAX Eclipse Plus C18 длиной 150 × 4,6 мм.

Подвижная фаза – 1,0 М буферный раствор натрия дигидрофосфата дигидрата с pH 3: вода особо чистая: ацетонитрил в соотношении 1:47:52 (по объему).

Длина волны детектора – 242 нм.

Скорость потока – 1,2 мл/мин.

Температура колонки – 55 °С.

Объем вводимой пробы – 10 мкл.

Время удерживания тикагелора – 4 ± 5 % мин.

Приготовление растворов

Приготовление основного раствора тикагелора с массовой концентрацией 1000 мкг/мл: растворяли $0,0526 \pm 0,0001$ г тикагелора (European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard, содержание – 99,9 %, Европейское управление качества лекарственных средств и здравоохранения, Франция, серия – 1, годен до 27.05.2023) в смеси ацетонитрила и воды особо чистой в соотношении 35:65 (по объему) в мерной колбе вместимостью 50 мл, обернутой алюминиевой фольгой.

Приготовление рабочего раствора тикагелора с массовой концентрацией 100 мкг/мл: разбавляли 5,0 мл основного раствора тикагелора смесью ацетонитрила и воды особо чистой в соотношении 35:65 (по объему) в мерной колбе вместимостью 50 мл, обернутой алюминиевой фольгой.

Приготовление 1,0 М буферного раствора натрия дигидрофосфата дигидрата с pH 3,0: в мерной колбе вместимостью 1000 мл растворяли 156,0 г натрия дигидрофосфата дигидрата в воде особо чистой, довели объем водой особо чистой до метки и перемешивали. Устанавливали pH раствора равным $3,0 \pm 0,2$ путем прибавления концентрированной о-фосфорной кислоты с потенциометрическим контролем.

Приготовление смеси ацетонитрила и воды особо чистой в соотношении 35:65 (по объему): в мерную колбу вместимостью 1000 мл наливали 350 мл ацетонитрила, довели до метки водой очищенной и перемешивали. Приготовление подвижной фазы: смесь 1,0 М буферного раствора натрия дигидрофосфата дигидрата с pH 3, воды особо чистой и ацетонитрила в соотношении 1:47:52 (по объему).

В мерной колбе вместимостью 1000 мл смешивали 10 мл 1,0 М буферного раствора натрия дигидрофосфата дигидрата с pH 3 и 470 мл воды особо чистой,

добавляли 520 мл ацетонитрила и перемешивали. Перед использованием подвижную фазу фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазировали.

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пиков (приборные единицы) от содержания тикагелора в хроматографируемом объеме градуировочных растворов, устанавливали по методу абсолютной градуировки по шести измерениям с разными концентрациями вещества в каждой серии, приготовленных из основного и рабочего растворов: 0,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 и 50,0 мкг/мл (рисунок 1).

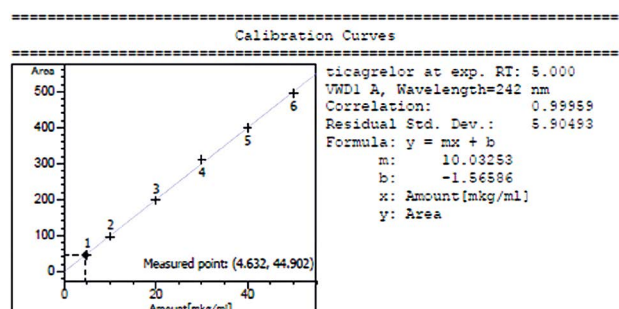


Рисунок 1. Пример градуировочного графика зависимости площади пика от концентрации тикагелора (мкг/мл)

Figure 1. Example of a calibration graph of the dependence of the peak area on the concentration of ticagrelor (mcg/ml)

Фильтр или сваб с отобранной пробой помещали в бокс, обернутый алюминиевой фольгой, прибавляли 5,0 мл смеси ацетонитрила и воды особо чистой в соотношении 35:65 (о/о), перемешивая стеклянной палочкой в течение 10 минут для лучшего растворения вещества. Затем фильтр или сваб тщательно отжимали, раствор переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, обернутую алюминиевой фольгой. Фильтр повторно обрабатывали 5,0 мл смеси ацетонитрила и воды особо чистой в соотношении 35:65 (о/о), помешивая при этом стеклянной палочкой в течение 10 минут, снова тщательно отжимали и удаляли. Раствор переносили в ту же мерную колбу, объем раствора довели до метки смесью ацетонитрила и воды особо чистой в соотношении 35:65 (о/о). Далее раствор фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм в хроматографическую вialу из темного стекла. Объем инъекции анализируемой пробы составлял 10 мкл.

Количественное определение содержания тикагелора (мкг/мл) в хроматографируемом объеме раствора анализируемой пробы проводили с помощью калибровочного графика (рисунок 2).

Массовую концентрацию тикагелора в воздухе рабочей зоны CAS (мкг/м³) и на смывах с поверхности CSW (мг/100м²) соответственно вычисляют по формулам:

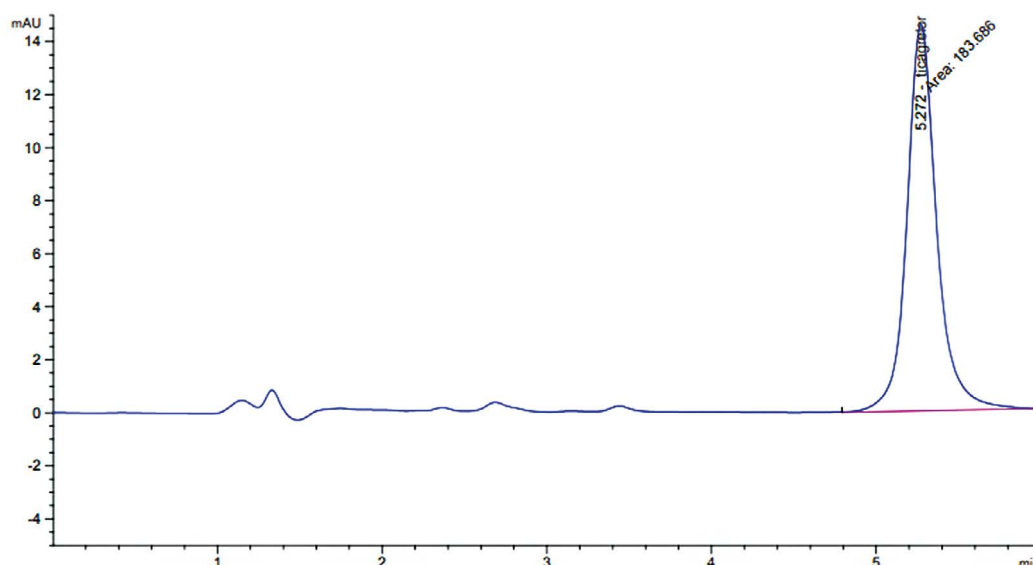


Рисунок 2. Типичная хроматограмма стандартного раствора тикагрелора с концентрацией 20 мкг/мл

Figure 2. Typical chromatogram of a 20 µg/mL ticagrelor standard solution

$$CAS = \frac{a \cdot B}{b \cdot V_{20}},$$

$$CSW = \frac{a \cdot B}{b \cdot 100 \text{ м}^2},$$

где a – содержание вещества в хроматографируемом объеме раствора анализируемой пробы, найденное по градуировочной характеристике, мкг; B – общий объем раствора анализируемой пробы, мл; b – хроматографируемый объем раствора анализируемой пробы, см³; V_{20} – объем воздуха, отобранный для анализа (дм³) и приведенный к стандартным условиям.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи пакета Microsoft Office Excel 2019.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В результате исследования были отобраны: 81 проба воздуха и 38 смывов с поверхности. При этом образцов фильтров, содержащих тикагрелор – 57, свабов – 37. У 4 проб воздуха наблюдалось превышение ориентировочного безопасного уровня воздействия (ОБУВ) тикагрелора в воздухе рабочей зоны, равного 0,4 мг/м³. (таблица 1).

Из данных, приведенных в таблице 1, видно, что 3 персональные пробы с завышенным содержанием тикагрелора были отобраны во время очистки оборудования после технологического процесса. Это указывает на необходимость использования СИЗ операторами, а также на возможную корректировку процесса очистки для снижения концентрации АФС в воздухе и, следовательно, для снижения риска для здоровья сотрудников. В дополнение к этому важно отметить, что ни одна завышенная персональная про-

Таблица 1. Пробы воздуха с превышением ОБУВ

Table 1. Air samples with excess of estimated safe exposure level

ID пробы Sample ID	Тип пробы Sample type	Технологический процесс Process step	Время работы (мин) Running time (min)	Объем воздуха (литры) Air volume (litre)	Концентрация (мкг/м ³) Concentration (µg/m ³)
AS44	Персональный Personal	Очистка фильтра от таблеточного прессы HEPA cleaning	6	11,93	452,325
AS45	Стационарный Stationary	Гранулирование Granulation	14	27,98	3296,401
AS57	Персональный Personal	Б очистка (гранулирование) Cleaning (granulation)	120	239,56	5202,269
AS72	Персональный Personal	Очистка оборудования после трех серий (гранулирование) Equipment cleaning after three series (granulation)	264	527,38	628,861

ба не была отобрана непосредственно во время технологического процесса, исходя из чего можно сделать вывод об удовлетворительной безопасности производства препарата Брилинта® [12]. Одна завышенная стационарная проба была отобрана на стадии грануляции около крышки смесителя при ее открытии, что следует исправить, выработав определенную методику по устранению, например установив дополнительную защиту или обучив персонал подходам к эксплуатации и очистки оборудования.

Кроме того, наблюдалось превышение допустимого содержания тикагрелора (0,01 мг / 100 см²) у 25 смылов с поверхности. 11 из них были отобраны на стадии взвешивания, 13 – на стадии гранулирования, 1 – на стадии таблетирования. Данные результаты указывают, главным образом, на необходимость корректирования работы операторов с целью повышения аккуратности их работы для уменьшения потенциальных источников загрязнения воздуха рабочей зоны тикагрелором.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате гигиенического мониторинга состояния воздуха рабочей зоны были выявлены критические точки процесса производства препарата Брилинта® по показателям загрязненности воздуха АФС. В целях снижения нежелательного вредного воздействия на персонал предприятия было указано на необходимость улучшения определенных операций и дополнительного обучения персонала новым подходам к эксплуатации и очистке оборудования. Дальнейшее применение данной методики гигиенического мониторинга желательно для контроля содержания АФС на необходимом уровне. Данные мероприятия, несомненно, повысят уровень безопасности на фармацевтическом предприятии в целом и снизят риски для здоровья операторов.

ЛИТЕРАТУРА

- Calhoun D. M., Coler A. B., Nieusma J. L. Strategies for preventing occupational exposure to potent compounds. *Toxicol Mech Methods*. 2011;21:93–96. DOI: 10.3109/15376516.2010.484621.
- Faber M. J., Galati G., Dinyer J. S. Handling of Highly Potent Pharmaceutical Compounds. *Chimica Oggi – Chemistry Today*. 2014;32(3):34–38.
- Куренкова Г. В., Жукова Е. В., Лемешевская Е. П. Пыль как вредный фактор производственной среды. Иркутск: Иркутский государственный медицинский университет; 2015. 88 с.
- 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;38:55–57. DOI:10.1093/occmed/38.3.55.
- Morawska L., Buonanno G. The physics of particle formation and deposition during breathing. *Nat Rev Phys*. 2021;3:300–301. DOI: 10.1038/s42254-021-00307-4.
- Raju S., Siddharthan T., McCormack M. C. Indoor Air Pollution and Respiratory Health. *Clinics in Chest Medicine*. 2020;41:825–843. DOI: 10.1016/j.ccm.2020.08.014.
- Wollowitz S. Managing High-Potency Active Pharmaceutical Ingredients-A Drug Sponsor's Guide. *Drug Development Research*. 2010;71. DOI:10.1002/ddr.20385.
- 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. *Environment International*. 2018;121:491–506. DOI:10.1016/j.envint.2018.09.043.
- McDermott H. J. Air Monitoring for Toxic Exposures. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2004. 688 p.
- Gimbel M., Qaderdan K., Willemssen L., Hermanides R., Bergmeijer T., de Vrey E., Heestermans T., Gin M. T. J., Waalewijn R., Hofma S., den Hartog F., Jukema W., von Birgelen C., Voskuil M., Kelder J., Deneer V., Berg J. T. Clopidogrel versus ticagrelor or prasugrel in patients aged 70 years or older with non-ST-elevation acute coronary syndrome (POPular AGE): the randomised, open-label, non-inferiority trial. *The Lancet*. 2020;395:1374–1381. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30325-1.
- Akkaif M. A., Ng M. L., S. K. Abdul Kader M. A., Daud N. A. A., Sha'aban A., Ibrahim B. A review of the effects of ticagrelor on adenosine concentration and its clinical significance. *Pharmacol Rep*. 2021;73:1551–1564. DOI: 10.1007/s43440-021-00309-0.
- Lagoutte-Renosi J., Royer B., Rabani V., Davani S. Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of Plasma Ticagrelor and Its Active Metabolite Useful for Research and Clinical Practice. *Molecules*. 2021;26:E278. DOI: 10.3390/molecules26020278.
- Mohammaden M. H., English S. W., Stapleton C. J., Khedr E., Shoyb A., Hegazy A., Elbassiouny A. Safety and efficacy of ticagrelor as single antiplatelet therapy in prevention of thromboembolic complications associated with the Pipeline Embolization Device (PED): multicenter experience. *J Neurointerv Surg*. 2020;12:1113–1116. DOI: 10.1136/neurintsurg-2020-015978.

REFERENCES

- Calhoun D. M., Coler A. B., Nieusma J. L. Strategies for preventing occupational exposure to potent compounds. *Toxicol Mech Methods*. 2011;21:93–96. DOI: 10.3109/15376516.2010.484621.
- Faber M. J., Galati G., Dinyer J. S. Handling of Highly Potent Pharmaceutical Compounds. *Chimica Oggi – Chemistry Today*. 2014;32(3):34–38.
- Kurenkova G. V., Zhukova E. V., Lemeshevskaya E. P. Dust as a harmful factor of the production environment. Irkutsk: Research Institute for Biomedical Technologies of Irkutsk State Medical University; 2015. 88 p. (In Russ.)
- 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;38:55–57. DOI:10.1093/occmed/38.3.55.
- Morawska L., Buonanno G. The physics of particle formation and deposition during breathing. *Nat Rev Phys*. 2021;3:300–301. DOI: 10.1038/s42254-021-00307-4.
- Raju S., Siddharthan T., McCormack M. C. Indoor Air Pollution and Respiratory Health. *Clinics in Chest Medicine*. 2020;41:825–843. DOI: 10.1016/j.ccm.2020.08.014.
- Wollowitz S. Managing High-Potency Active Pharmaceutical Ingredients-A Drug Sponsor's Guide. *Drug Development Research*. 2010;71. DOI:10.1002/ddr.20385.
- 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. *Environment International*. 2018;121:491–506. DOI:10.1016/j.envint.2018.09.043.
- McDermott H. J. Air Monitoring for Toxic Exposures. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2004. 688 p.
- Gimbel M., Qaderdan K., Willemssen L., Hermanides R., Bergmeijer T., de Vrey E., Heestermans T., Gin M. T. J., Waalewijn R., Hofma S., den Hartog F., Jukema W., von Birgelen C., Voskuil M., Kelder J., Deneer V., Berg J. T. Clopidogrel versus ticagrelor or prasugrel in patients aged 70 years or older with non-ST-elevation acute coronary syndrome (POPular AGE): the randomised, open-label, non-inferiority trial. *The Lancet*. 2020;395:1374–1381. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30325-1.
- Akkaif M. A., Ng M. L., S. K. Abdul Kader M. A., Daud N. A. A., Sha'aban A., Ibrahim B. A review of the effects of ticagrelor on adenosine concentration and its clinical significance. *Pharmacol Rep*. 2021;73:1551–1564. DOI: 10.1007/s43440-021-00309-0.
- Lagoutte-Renosi J., Royer B., Rabani V., Davani S. Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of Plasma Ticagrelor and Its Active Metabolite Useful for Research and Clinical Practice. *Molecules*. 2021;26:E278. DOI: 10.3390/molecules26020278.
- Mohammaden M. H., English S. W., Stapleton C. J., Khedr E., Shoyb A., Hegazy A., Elbassiouny A. Safety and efficacy of ticagrelor as single antiplatelet therapy in prevention of thromboembolic complications associated with the Pipeline Embolization Device (PED): multicenter experience. *J Neurointerv Surg*. 2020;12:1113–1116. DOI: 10.1136/neurintsurg-2020-015978.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-159-168>
УДК 615.072



Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в препаратах аллергенов методом ГЖХ

Р. А. Бубенчиков¹, Е. И. Саканян¹, Н. В. Зубкова¹, В. П. Добрынин¹, С. В. Горяинов²✉, Ф. Хажжар², Е. А. Платонов², Д. И. Писарев², Р. А. Абрамович²

¹ АО «НПО «Микроген», 127473, Россия, г. Москва, 2-й Волконский пер, д.10

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

✉ Контактное лицо: Горяинов Сергей Владимирович. E-mail: goryainovs@list.ru

ORCID: Р. А. Бубенчиков – <https://orcid.org/0000-0003-0955-6892>; Е. И. Саканян – <https://orcid.org/0000-0002-1693-2422>; Н. В. Зубкова – <https://orcid.org/0000-0001-5795-4401>; В. П. Добрынин – <https://orcid.org/0000-0003-2487-8152>; С. В. Горяинов – <https://orcid.org/0000-0002-7625-9110>; Ф. Хажжар – <https://orcid.org/0000-0001-8819-9349>; Е. А. Платонов – <https://orcid.org/0000-0002-6625-6653>; Д. И. Писарев – <https://orcid.org/0000-0002-2996-7712>; Р. А. Абрамович – <https://orcid.org/0000-0003-1784-881X>.

Статья поступила: 23.08.2021

Статья принята в печать: 04.05.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. В последние десятилетия мировая фармакопейная практика уделяет особое внимание чистоте лекарственных средств. Определен перечень возможных примесей, присутствие которых в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах допустим в установленных пределах, гарантирующих отсутствие токсического действия на организм человека при их приеме. Существуют примеси родственные, технологические и др. К числу технологических примесей относят, в том числе остаточные количества органических растворителей, используемых в технологии получения как фармацевтических субстанций, так и лекарственных препаратов. В рамках гармонизации требований национальной фармакопеи, фармакопеи ЕАЭС и ведущих зарубежных фармакопей в отечественную фармакопейную практику введен такой обязательный показатель качества, как содержание остаточных органических растворителей, в случае использования последних в технологическом процессе. В действующей ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» указаны общие принципы определения этого показателя качества и нормативные требования к содержанию этих растворителей в зависимости от класса токсичности. При производстве препаратов аллергенов в ряде случаев, в частности при работе с пыльцевыми аллергенами, в технологическом процессе используются органические растворители третьего класса токсичности: диэтиловый эфир и ацетон, предельное содержание которых составляет до 0,5 % (5000 ppm). При этом в производственном процессе препаратов аллергенов для обезжиривания и очистки могут использоваться как диэтиловый эфир или ацетон, так и оба растворителя одновременно, поэтому для их определения целесообразна разработка и использование унифицированной методики, ориентированной на применение при оценке качества конкретного лекарственного препарата аллергена.

Цель. Целью исследования являлась разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в препаратах аллергенов.

Материалы и методы. Исследования проведены методом газо-жидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектором с инжестированием исследуемых образцов с помощью автосэмплера на капиллярной кварцевой колонке Zebron ZB-624 (G43, 6 % цианопротилфенил / 94 % диметилполисилоксан).

Результаты и обсуждение. Подобраны условия хроматографического разделения ацетона и диэтилового эфира на капиллярной кварцевой колонке. Определены параметры пригодности хроматографической системы. Проведена валидация разработанной методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, предел количественного определения, правильность и прецизионность на уровне повторяемости и внутрилабораторной прецизионности. Определено содержание ацетона и диэтилового эфира в 26 препаратах аллергенов. Результаты количественного определения диэтилового эфира и ацетона в препаратах аллергенов, в технологическом процессе которых используются ООР, находятся в диапазоне 0,0053–0,0524 % для диэтилового эфира и 0,0029–0,0994 % для ацетона. Таким образом, содержание диэтилового эфира и ацетона во всех исследованных препаратах аллергенов было ниже установленной нормы (менее 0,5 %).

Заключение. Разработана аналитическая методика определения количественного содержания диэтилового эфира и ацетона в препаратах аллергенов с помощью метода ГЖХ, методика валидирована по характеристикам, отвечающим требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». Проведенный в соответствии с разработанной методикой анализ препаратов аллергенов свидетельствует о том, что во всех препаратах содержание диэтилового эфира и ацетона составляет не более 0,5 %, что отвечает требованиям ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители». Следовательно, использование данной методики позволяет существенно повысить качество лекарственных препаратов аллергенов, в технологии получения которых используются органические растворители, так как контроль содержания их остаточных количеств гарантирует безопасность применения этих препаратов и их соответствие требованиям международных стандартов.

Ключевые слова: препараты аллергенов, остаточные органические растворители, газо-жидкостная хроматография, валидация

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

Вклад авторов. Р. А. Бубенчиков, Е. И. Саканян, Н. В. Зубкова, В. П. Добрынин, Ф. Хажжар, Е. А. Платонов., Д. И. Писарев – проведение эксперимента по разработке и валидации аналитической методики определения количественного содержания диэтилового эфира и ацетона. С. В. Горяинов – проведение валидационных испытаний, написание текста. Р. А. Абрамович – методология и дизайн исследования.

© Бубенчиков Р. А., Саканян Е. И., Зубкова Н. В., Добрынин В. П., Горяинов С. В., Хажжар Ф., Платонов Е. А., Писарев Д. И., Абрамович Р. А., 2022

© Bubenchikov R. A., Sakanyan E. I., Zubkova N. V., Dobrynin V. P., Goriainov S. V., Hajjar F., Platonov E. A., Pisarev D. I., Abramovich R. A., 2022

Благодарность. Публикация выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН.

Для цитирования: Бубенчиков Р. А., Саканян Е. И., Зубкова Н. В., Добрынин В. П., Горяинов С. В., Хажжар Ф., Платонов Е. А., Писарев Д. И., Абрамович Р. А. Разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в препаратах аллергенов методом ГЖХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(2):159–168. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-159-168>

Development and Validation of a Procedure for the Quantitative Determination of Residual Organic Solvents in Allergen Preparations by GC

Roman A. Bubenchikov¹, Elena I. Sakanyan¹, Nataliya V. Zubkova¹, Valerii P. Dobrynin¹, Sergey V. Goriainov²✉, Fadi Hajjar², Evgeniy A. Platonov², Dmitry I. Pisarev², Rimma A. Abramovich²

¹ JSC "SIC "Microgen", 10, the 2nd Volkonsky lane, Moscow, 127473, Russia

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

✉ **Corresponding author:** Sergey V. Goriainov. E-mail: goryainovs@list.ru

ORCID: Roman A. Bubenchikov – <https://orcid.org/0000-0003-0955-6892>; Elena I. Sakanyan – <https://orcid.org/0000-0002-1693-2422>;

Nataliya V. Zubkova – <https://orcid.org/0000-0001-5795-4401>; Valerii P. Dobrynin – <https://orcid.org/0000-0003-2487-8152>;

Sergey V. Goriainov – <https://orcid.org/0000-0002-7625-9110>; Fadi Hajjar – <https://orcid.org/0000-0001-8819-9349>; Evgeniy A. Platonov – <https://orcid.org/0000-0002-6625-6653>;

Dmitry I. Pisarev – <https://orcid.org/0000-0002-2996-7712>; Rimma A. Abramovich – <https://orcid.org/0000-0003-1784-881X>.

Received: 23.08.2021

Revised: 04.05.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. One of the requirements for the quality of pharmaceuticals, including allergens, is the determination of residual organic solvents in them. In the production of allergen preparations, in a number of cases in the technological process, organic solvents of the third toxicity class are used, diethyl ether and acetone, which are solvents of low toxicity and their maximum content is allowed up to 0.5 % (5000 ppm). Since diethyl ether or acetone, and in some cases both solvents can be used simultaneously in the production process of allergen preparations for degreasing and cleaning, it is therefore advisable to develop and use a unified technique to determine them.

Aim. The aim of the study was to develop and validate a method for the quantitative determination of residual organic solvents in allergen preparations.

Materials and methods. The studies were carried out by gas-liquid chromatography with a flame ionization detector with injection of the test samples using an autosampler on a Zebron ZB-624 capillary quartz column (G43, 6 % cyanopropylphenyl / 94 % dimethylpoly siloxane).

Results and discussion. The conditions for the chromatographic separation of acetone and diethyl ether on a capillary quartz column were selected. The parameters of the suitability of the chromatographic system have been determined. The developed method was validated according to the following characteristics: specificity, linearity, limit of quantitative determination, correctness and precision at the level of repeatability and intra-laboratory precision. The content of acetone and diethyl ether in 26 preparations of allergens was determined. The results of the quantitative determination of diethyl ether and acetone in allergen preparations, in the technological process of which OOP are used, are in the range of 0.0053–0.0524 % for diethyl ether and 0.0029–0.0994 % for acetone. Thus, the content of diethyl ether and acetone in all tested allergen preparations was below the established norm (less than 0.5 %).

Conclusion. An analytical method has been developed for determining the quantitative content of diethyl ether and acetone in allergen preparations using the GLC method; the method has been validated according to characteristics that meet the requirements of General Pharmacopoeia Monograph 1.1.0012.15 "Validation of analytical methods". The analysis of allergen preparations was carried out in accordance with the methodology. In all preparations, the content of diethyl ether and acetone was no more than 0.5 %.

Keywords: allergen preparations, residual organic solvents, gas 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. Roman A. Bubenchikov, Elena I. Sakanyan, Nataliya V. Zubkova, Valerii P. Dobrynin, Fadi Hajjar, Evgeniy A. Platonov, Dmitry I. Pisarev – conducting an experiment to develop and validate an analytical method for determining the quantitative content of diethyl ether and acetone. Sergey V. Goriainov – conducting validation tests, writing text. Rimma A. Abramovich – research methodology and design.

Acknowledgment. This paper has been supported by the RUDN University Strategic Academic Leadership Program.

For citation: Bubenchikov R. A., Sakanyan E. I., Zubkova N. V., Dobrynin V. P., Goriainov S. V., Hajjar F., Platonov E. A., Pisarev D. I., Abramovich R. A. Development and validation of a procedure for the quantitative determination of residual organic solvents in allergen preparations by GC. *Drug development & registration.* 2022;11(2):159–168. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-159-168>

ВВЕДЕНИЕ

Вопросам безопасности и эффективности иммунобиологических лекарственных препаратов придается большее значение как в России, так и во всем мире. На сегодняшний день такие иммунобиологиче-

ские препараты, как аллергены, нашли широкое применение в клинической практике для диагностики и лечения аллергических заболеваний, вызванных иммунологическими реакциями повышенной чувствительности (IgE-зависимые) к аллергенам различной природы.

В последние десятилетия мировая фармакопейная практика уделяет особое внимание чистоте лекарственных средств. Определен перечень возможных примесей, присутствие которых в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах допустим в установленных пределах, гарантирующих отсутствие токсического действия на организм человека при их приеме. Существуют примеси родственные, технологические и др. К числу технологических примесей относят, в том числе остаточные количества органических растворителей, используемых в технологии получения как фармацевтических субстанций, так и лекарственных препаратов. В рамках гармонизации требований национальной фармакопеи, фармакопеи ЕАЭС и ведущих зарубежных фармакопей в отечественную фармакопейную практику введен такой обязательный показатель качества, как содержание остаточных органических растворителей, в случае использования последних в технологическом процессе [1–5]. В действующей ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» указаны общие принципы определения этого показателя качества и нормативные требования к содержанию этих растворителей в зависимости от класса токсичности.

Согласно ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» остаточные органические растворители (ООР) – летучие растворители, которые используются или образуются на любой стадии производства фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ или лекарственного препарата полностью не удаляются после завершения технологического процесса¹.

При производстве препаратов аллергенов в ряде случаев, в частности при работе с пыльцевыми аллергенами, в технологическом процессе используются органические растворители третьего класса токсичности: диэтиловый эфир и ацетон, предельное содержание которых составляет до 0,5 % (5000 ppm).

Фармакопея Евразийского экономического союза предлагает проводить определение содержания остаточных органических растворителей любыми подходящими методиками, описанными в фармакопеях. Одним из современных методов идентификации и количественного определения ООР, согласно ведущим Фармакопеям, является газо-жидкостная хроматография с пламенно-ионизационным детектированием [6, 7]. Например, Фармакопея США в общей статье <467> дает рекомендации для разделения определяемых целевых компонентов использовать колонки с неподвижной фазой G43 и G16². Для решения поставленной задачи было принято решение

опробовать колонки с обеими неподвижными фазами (хроматографические колонки Zebron ZB-624 и ZB-WAX). При этом в производственном процессе препаратов аллергенов для обезжиривания и очистки могут использоваться как диэтиловый эфир или ацетон, так и оба растворителя одновременно, поэтому для их определения целесообразна разработка и использование унифицированной методики, ориентированной на применение при оценке качества конкретного лекарственного препарата аллергена [8–10].

Цель работы – разработка, апробация и валидация методики определения содержания ООР (диэтилового эфира, ацетона или их комбинаций) в препаратах аллергенов методом газо-жидкостной хроматографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены на образцах препаратов бытовых, пищевых и эпидермальных аллергенов.

В качестве стандартных образцов диэтилового эфира и ацетона, а также растворителя диметилсульфоксида (ДМСО) применялись реактивы с качеством для ГЖХ производства Merck KGaA, Германия (с чистотой не менее 99,9 %).

Разработка и валидация аналитической методики определения количественного содержания диэтилового эфира и ацетона проводилась на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором Agilent 7890A (Agilent Technologies, США).

Для хроматографического анализа применялась капиллярная кварцевая колонка Zebron ZB-624, длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 1,8 мкм (кат. № 1023593) и капиллярная кварцевая колонка Zebron ZB-WAX, длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0,25 мкм (кат. № 1008621).

Валидацию аналитической методики проводили в соответствии с ГФ РФ XIV издания, ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»³.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На выбор условий хроматографического анализа ведущее влияние оказали физико-химические свойства диэтилового эфира и ацетона. Для выбора оптимальных условий анализа была изучена их хроматографическая подвижность.

Времена выхода диэтилового эфира и ацетона на колонке Zebron ZB-WAX (G16) 1,7 и 2,1 мин соответственно. Времена выхода диэтилового эфира и ацетона на хроматографической колонке Zebron ZB-624 (G43) составили 4,4 и 5,1 мин соответственно. Таким образом, для разработки методики была выбрана

¹ ОФС.1.1.0008.15. «Остаточные органические растворители». Доступно по: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0008-15-ostatochnye-organicheskie-rastvoriteli/> Ссылка активна на 23.02.2022.

² The United States Pharmacopeia, USP38/NF33. Residual Solvents <467>. The United States Pharmacopeial Convention. Rockville (MD). USA. 2012. Available at: https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/generalChapter467Current.pdf. Accessed: 23.02.2022.

³ ОФС.1.1.0012.15. «Валидация аналитических методик». Доступно по: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik/> Ссылка активна на 23.02.2022.

хроматографическая колонка Zebtron ZB-624 (94 % полидиметилсилоксан / 6 % цианопропилфенил), т. к. она обеспечила лучшее разделение целевых компонентов. Наиболее часто применяемым методом измерения количественного содержания легколетучих компонентов на фоне матрикса неизвестного генезиса является использование варианта парофазного инжестирования проб, однако было принято решение остановиться на инжестировании исследуемых образцов с помощью автосэмплера, так как при использовании парофазного ввода проб было обнаружено образование артефактных соединений в системе. При проведении оптимизации условий хроматографического разделения диэтилового эфира и ацетона изучали влияние скорости газа-носителя, температурных режимов термостата и инжектора на их разделение. Подобрали градиент хроматографического разделения для оптимизации и ускорения процесса анализа единичного образца в сравнение с процедурой А статьи USP <467>.

Наилучшего разделения диэтилового эфира и ацетона удалось добиться при следующих условиях: газовый хроматограф Agilent 7890 с пламенно-ионизационным детектором; расход ПИД: воздуха 400 мл/мин, водорода 40 мл/мин; колонка: капиллярная кварцевая колонка Zebtron ZB-624, длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 1,8 мкм (кат. № 1023593).

Скорость подачи газа-носителя (гелий): 1,5 мл/мин; деление потока: 50:1; температура термостата колонки начальная 40 °C в течение 5 мин, подъем температуры до 240 °C со скоростью 25 °C/мин, затем выдержка в течение 1 мин; температура инжектора: 250 °C; температура детектора 260 °C; объем вводимого испытуемого раствора 1,0 мкл; время хроматографирования: 14 мин.

Типичная хроматограмма испытуемого раствора представлена на рисунке 1, А. Время выхода диэтилового эфира около 4,4 мин, ацетона около 5,1 мин. Также на хроматограмме помимо пиков ООР присутствуют сигналы, соответствующие фенолу (12,1 мин) и бензойной кислоте (13,2 мин), которые включаются в состав в качестве консервантов. Таким образом, для целей контроля ООР в препаратах аллергенов следует учитывать пики на хроматограммах с временами выхода до 7,0 мин.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Проверку пригодности проводят по следующим параметрам: эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам диэтилового эфира и ацетона на хроматограмме стандартного раствора, выраженная числом теоретических тарелок (NTP); фактор асимметрии пиков диэтилового эфира и ацетона (As); величина относительного стандартного отклонения (RSD); разрешение между пиками диэтилового эфира и ацетона (Rs) (таблица 1).

Таблица 1. Параметры пригодности хроматографической системы для диэтилового эфира и ацетона (n = 6)

Table 1. Parameters of suitability of the chromatographic system for diethyl ether and acetone (n = 6)

Органический растворитель Organic solvent	Время удерживания (RT), мин Retention time (RT), min	Площади пиков (S), mAu · s Peak areas (S), mAu · s	Фактор асимметрии пиков (As) Peak asymmetry factor (As)	Число теоретических тарелок (NTP) Theoretical plate number (NTP)
Диэтиловый эфир <i>Diethyl ether</i>				
	4,439	649	1,06	43685
	4,440	645	1,06	42547
	4,441	638	1,06	42896
	4,439	635	1,05	43245
	4,440	641	1,07	43587
	4,441	643	1,06	42987
RSD, %	0,02	0,8	–	–
Ацетон <i>Acetone</i>				
	5,123	750	1,07	51948
	5,124	776	1,07	51547
	5,122	771	1,08	51014
	5,125	760	1,07	52145
	5,122	759	1,08	52578
	5,124	772	1,08	52025
RSD, %	0,02	1,3	–	–

Хроматограмма стандартного раствора представлена на рисунке 1, Б. Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам диэтилового эфира и ацетона на хроматограммах стандартного раствора, составляет не менее 42 547 и 51 014, что соответствует критериям приемлемости (не менее 10 000 теоретических тарелок).

Фактор асимметрии пиков диэтилового эфира и ацетона на хроматограмме стандартного раствора составляет 1,06 и 1,07, что соответствует критериям приемлемости (не менее 0,8 и не более 1,6).

Относительное стандартное отклонение площадей пиков диэтилового эфира и ацетона на хроматограмме стандартного раствора составляет 0,8 и 1,3 %, что соответствует критериям приемлемости (не должно превышать 2,0 %).

Разрешение между пиками диэтилового эфира и ацетона на хроматограмме стандартного раствора составляет 7,8, что соответствует критериям приемлемости (не менее 2,0).

Таким образом, выбранные хроматографические условия обеспечивают удовлетворительное разделение диэтилового эфира и ацетона.

Валидацию разработанной методики проводили по следующим параметрам: специфичность, линейность, предел количественного определения (ПКО), правильность, прецизионность.

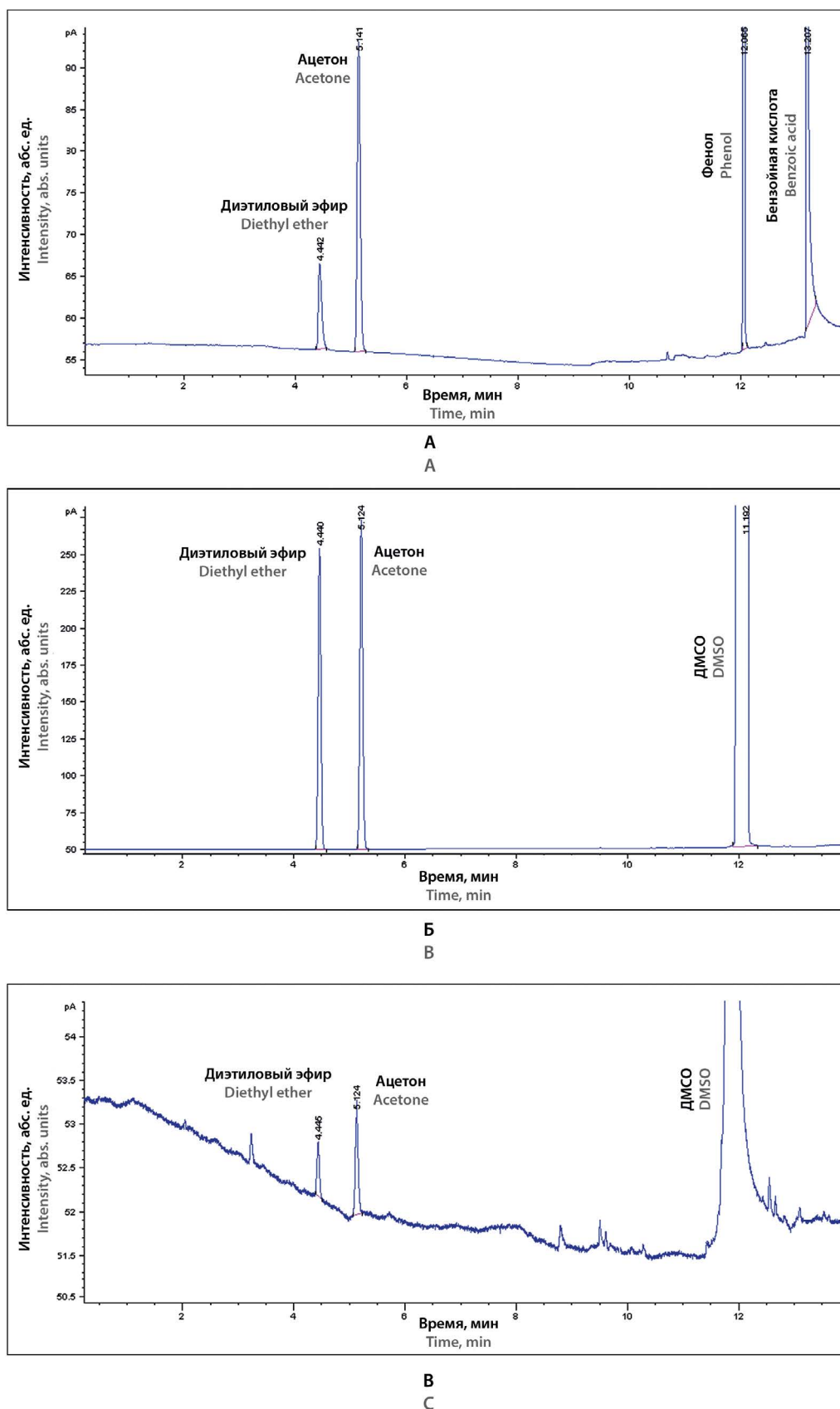


Рисунок 1. Типичные хроматограммы испытуемого раствора (А), стандартного раствора (Б), раствора с концентрацией диэтилового эфира и ацетона на уровне ПКО (В)

Figure 1. Typical chromatograms of test solution (A), standard solution (B), solution with the concentration of diethyl ether and acetone at the LOQ level (C)

Специфичность методики количественного определения диэтилового эфира и ацетона подтверждена набором хроматограмм раствора «бланк» (растворителя), раствора плацебо, стандартного раствора и испытуемого раствора. Времена удерживания диэтилового эфира и ацетона на хроматограммах стандартного и испытуемого растворов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Времена удерживания диэтилового эфира и ацетона стандартного и испытуемого растворов

Table 2. Retention times of diethyl ether and acetone of the standard and test solutions

Время удерживания, мин (RT) Retention time (RT), min	Соединение Compound	Число теоретических тарелок (NTP) Theoretical plate number (NTP)	Разрешение (R) Resolution (R)	Асимметрия (As) Asymmetry (As)
<i>Стандартный раствор</i> Standard solution				
4,440	Диэтиловый эфир Diethyl ether	43685	–	1,05
5,124	Ацетон Acetone	51948	7,80	1,07
<i>Испытуемый раствор</i> Sample solution				
4,442	Диэтиловый эфир Diethyl ether	26214	–	1,53
5,141	Ацетон Acetone	38539	6,52	1,25

В результате установлена специфичность методики для определения ацетона и диэтилового эфира и исключена возможность присутствия пиков, которые могут мешать определению растворителей.

Для проверки линейности были приготовлены и проанализированы серия растворов стандартных образцов диэтилового эфира и ацетона. Линейная за-

висимость наблюдалась во всем изучаемом диапазоне от 10 до 150 % от нормируемого содержания. Значения коэффициентов корреляции для линейной зависимости составляют более 0,995, что подтверждает линейность методики количественного определения диэтилового эфира и ацетона (рисунок 2).

Пределы количественного определения (ПКО) нормируемых ООР находили экспериментально путем приготовления серии разведений стандартного раствора. Для раствора, содержащего диэтиловый эфир и ацетон на уровне предела количественного определения, соотношение сигнал/шум должно быть не менее 10:1 (рисунок 1, В).

Значения ПКО для диэтилового эфира и ацетона от нормируемого содержания составили 0,0025 мг/мл. Данные значения находятся ниже диапазона применения методики количественного определения, что соответствует критериям приемлемости методики.

Правильность методики количественного определения диэтилового эфира и ацетона доказывали методом добавок, для этого готовили модельные смеси путем прибавления диэтилового эфира и ацетона к раствору плацебо до концентрации ПКО, 100 и 150 % от номинальной (9 измерений, 3 концентрации внутри определяемого диапазона). Рассчитывали открываемость (отношение найденного содержания к введенному, выраженное в процентах) (таблица 3).

Открываемость диэтилового эфира и ацетона принадлежит интервалу 98–102 %. Коэффициент вариации открываемости диэтилового эфира и ацетона не превышает 2,0 % ($n = 9$), как и требуется по критериям приемлемости.

Прецизионность разработанной методики устанавливали в виде повторяемости и внутрилабораторной прецизионности. Для определения повторяемости определяли содержание диэтилового эфира и ацетона в препарате аллергена в шести повторностях в течении одного рабочего дня (таблица 4).

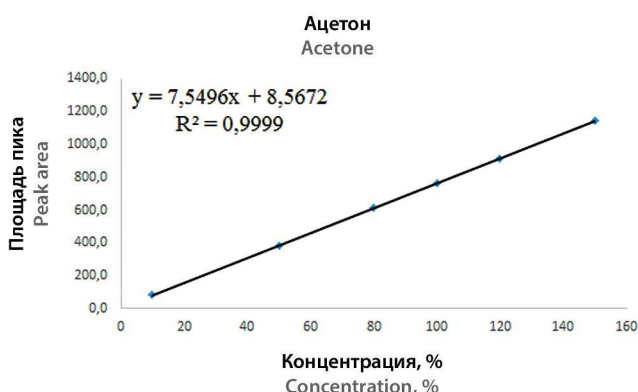
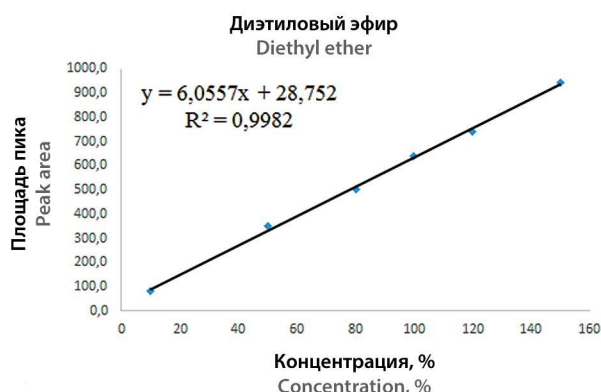


Рисунок 2. Линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации диэтилового эфира и ацетона (% от нормируемого содержания)

Figure 2. Linear dependence of the analytical signal on the concentration of diethyl ether and acetone (% of the limit content)

Таблица 3. Результаты оценки правильности методики определения диэтилового эфира и ацетона**Table 3.** Results of assessing the correctness of the method for determining diethyl ether and acetone

Статистические характеристики Statistical characteristics	Результаты Results	
	Диэтиловый эфир Diethyl ether	Ацетон Acetone
Наименьшее значение, X , % Minimal value, X , %	98,4	98,7
Наибольшее значение, X , % Maximum value, X , %	101,9	101,8
Среднее значение, X_{cp} , % Average value, X_{av} , %	100,6	100,7
Дисперсия, S^2 Variance, S^2	1,36	1,10
Стандартное отклонение, S Standard deviation, S	1,17	1,05
Стандартное отклонение среднего результата, S_0 Standard error, S_0	0,39	0,35
Коэффициент вариации, S_{0r} , % Coefficient of variation, S_{0r} , %	1,16	1,04
Доверительный интервал ($P = 0,95$), % Confidence interval ($P = 0,95$), %	0,9 (от 99,7 до 101,5) 0,9 (from 99,7 to 101,5)	0,8 (от 99,9 до 101,5) 0,8 (from 99,9 to 101,5)

Полученные значения коэффициента вариации результатов количественного определения диэтилового эфира и ацетона не превышают 2,0 %, что и требуется по критериям приемлемости.

Для оценки внутрилабораторной прецизионности исследования проводили в течение двух рабочих дней с использованием свежеприготовленных растворов. Рассчитывали содержание диэтилового эфира и ацетона, среднее значение, стандартное отклонение, стандартное отклонение среднего результата, коэффициент вариации по результатам количественного определения диэтилового эфира и ацетона в испытуемых образцах ($n = 6$) (таблица 5).

Значения коэффициента вариации результатов количественного определения диэтилового эфира и ацетона не превышает 2,0 %, что отвечает критериям приемлемости.

Различия между дисперсиями средних результатов двух выборок статистически незначимы. При сравнении результатов, полученных в разные дни, различия в воспроизводимостях отсутствуют, т. е. случайные погрешности одного порядка.

Проведенные исследования по установлению валидационных показателей характеризуют разработанную методику как специфичную, точную и достоверную для определения ООР в производстве препаратов аллергенов.

Разработанная методика количественного определения ООР была использована для анализа в препаратах аллергенов.

Для приготовления стандартного раствора в мерную колбу вместимостью 50,0 мл помещали около 250,0 мг (точная навеска) диэтилового эфира и около 250,0 мг (точная навеска) ацетона, доводили объем раствора ДМСО до метки и перемешивали (концентрация диэтилового эфира и ацетона около 5,0 мг/мл).

Испытуемый раствор готовили следующим образом: около 1,0 мл испытуемого образца помещали в стеклянную хроматографическую вials для проведения анализа и взвешивали.

Содержание диэтилового эфира и ацетона рассчитывали по методу внешнего стандарта [14]. Содержание диэтилового эфира и ацетона (X , %) в препаратах аллергенов рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 50 \cdot 100} = \frac{S \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot 50},$$

где S – площадь пика диэтилового эфира или ацетона на хроматограммах испытуемого раствора; S_0 – средняя площадь пика диэтилового эфира или ацетона на хроматограммах стандартного раствора; a_0 – навеска диэтилового эфира или ацетона, взятая для приготовления стандартного раствора, мг; a – навеска испытуемого образца, мг; P – чистота диэтилового эфира или ацетона, %.

Результаты количественного определения диэтилового эфира и ацетона в препаратах аллергенов, в технологическом процессе которых используются ООР, находятся в диапазоне 0,0053–0,0524 % для диэтилового эфира и 0,0029–0,0994 % для ацетона. Таким образом, содержание диэтилового эфира и ацетона во всех исследованных препаратах аллергенов было ниже установленной нормы (менее 0,5 %).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана аналитическая методика определения количественного содержания диэтилового эфира и ацетона в препаратах аллергенов с помощью метода ГЖХ, методика валидирована по характеристикам, отвечающим требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик».

Проведенный в соответствии с разработанной методикой анализ препаратов аллергенов свидетельствует о том, что во всех препаратах содержание диэтилового эфира и ацетона составляет не более 0,5 %, что отвечает требованиям ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители».

Следовательно, использование данной методики позволяет существенно повысить качество лекарственных препаратов аллергенов, в технологии получения которых используются органические растворители, так как контроль содержания их остаточных количеств гарантирует безопасность применения этих препаратов и их соответствие требованиям международных стандартов.

Таблица 4. Оценка повторяемости методики количественного определения диэтилового эфира и ацетона ($n = 6$)

Table 4. Evaluation of the repeatability of the method for the quantitative determination of diethyl ether and acetone ($n = 6$)

Диэтиловый эфир ($a_0 = 253,0$ мг; $S_0 = 647,2$) Diethyl ether ($a_0 = 253,0$ mg; $S_0 = 647,2$)	S_1	S_2	S_3	$S_{\text{ср.}}$ $S_{\text{av.}}$	a , мг a , mg	X , %
	44,1	43,9	44,1	44,03	999,6	0,0344
	43,8	44,2	43,9	43,97	999,3	0,0343
	44,1	44,2	44,1	44,13	999,8	0,0344
	43,2	43,1	43,2	43,17	999,8	0,0337
	43,3	43,4	43,7	43,47	999,5	0,0339
	42,9	43,2	43,5	43,20	998,9	0,0337
Среднее значение (X), % Average value (X), %						0,0341
Дисперсия, S^2 Variance, S^2						1,13279E-07
Стандартное отклонение, S Standard deviation, S						0,000336
Стандартное отклонение среднего результата, S_0 Standard error, S_0						0,000137
Коэффициент вариации, $S_{\text{в}}, \%$ Coefficient of variation, $S_{\text{v}}, \%$						0,987
Доверительный интервал ($P = 0,95$), % Confidence interval ($P = 0,95$), %						0,0337–0,0344
Ацетон ($a_0 = 253,8$ мг; $S_0 = 770,0$) Acetone ($a_0 = 253,8$ mg; $S_0 = 770,0$)	S_1	S_2	S_3	$S_{\text{ср.}}$ $S_{\text{av.}}$	a , мг a , mg	X , %
	146,5	146,8	146,7	146,67	999,6	0,0965
	145,9	146,0	146,1	146,05	999,3	0,0962
	151,1	151,4	151,2	151,23	999,8	0,0995
	151,6	151,7	151,6	151,63	999,8	0,0998
	145,8	145,9	146,0	145,90	999,5	0,0960
	145,2	145,1	145,1	145,13	998,9	0,0956
Среднее значение (X), % Average value (X), %						0,0973
Дисперсия, S^2 Variance, S^2						3,49767E-06
Стандартное отклонение, S Standard deviation, S						0,001870
Стандартное отклонение среднего результата, S_0 Standard error, S_0						0,000763
Коэффициент вариации, $S_{\text{в}}, \%$ Coefficient of variation, $S_{\text{v}}, \%$						1,923
Доверительный интервал ($P = 0,95$), % Confidence interval ($P = 0,95$), %						0,0953–0,0992

На основании изложенного можно рекомендовать включить показатель качества и разработанную методику определения количественного содержания ООР в проект НД на препараты аллергенов.

ЛИТЕРАТУРА

- Олефир Ю. В., Саканян Е. И., Шишова Л. И., Сенченко С. П. Фармакопейные требования к качеству лекарственных препаратов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;(52)11:48–54. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-11-48-54.
- Таубэ А. А., Гилек М. Т., Саканян Е. И. Методические подходы к повышению качества лекарственного растительного сырья морфологической группы «пыльца». *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;(55)12:56–60. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-12-56-60.
- Невская Л. В., Лавренчик Е. И., Жданова М. Ю., Фадейкина О. В., Капитанова В. К. Международный опыт стандартизации препаратов аллергенов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(4):222–229.
- Олефир Ю. В., Саканян Е. И., Шемерянкина Т. Б., Сенченко С. П., Зайцев С. А., Бармин А. В. Стандартизация фармацевтических субстанций по разделу «чистота». *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;(52)8:56–60. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-8-56-60.

Таблица 5. Оценка внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения диэтилового эфира и ацетона

Table 5. Evaluation of the in-laboratory precision of the method for the quantitative determination of diethyl ether and acetone

Диэтиловый эфир ($a_0 = 252,6$ мг; $S_0 = 640,2$) Diethyl ether ($a_0 = 252,6$ mg; $S_0 = 640,2$)	S_1	S_2	S_3	$S_{\text{ср.}} S_{\text{ав.}}$	a , мг a , mg	X , %
	44,2	44,1	44,1	44,13	999,6	0,0348
	43,4	43,8	43,6	43,60	999,4	0,0344
	44,1	44,2	44,1	44,13	999,7	0,0348
	44,5	44,4	44,4	44,43	1000,2	0,0350
	43,1	43,4	43,2	43,23	999,5	0,0341
	43,5	43,8	43,0	43,43	999,5	0,0342
Среднее значение (X), % Average value (X), %						0,0345
Дисперсия, S^2 Variance, S^2						1,33E-07
Стандартное отклонение, S Standard deviation, S						0,000364
Стандартное отклонение среднего результата, S_0 Standard error, S_0						0,000149
Коэффициент вариации, S_{σ} , % Coefficient of variation, S_{σ} , %						1,054
Доверительный интервал ($P = 0,95$), % Confidence interval ($P = 0,95$), %						0,0341–0,0349
Ацетон ($a_0 = 251,8$ мг; $S_0 = 760,6$) Acetone ($a_0 = 251,8$ mg; $S_0 = 760,6$)	S_1	S_2	S_3	$S_{\text{ср.}} S_{\text{ав.}}$	a , мг a , mg	X , %
	146,5	146,8	146,7	146,67	999,6	0,0970
	145,9	145,2	145,6	145,57	999,4	0,0962
	151,1	150,8	151,2	151,03	999,7	0,0998
	151,6	151,7	151,6	151,63	1000,2	0,1002
	147,2	146,9	147,0	147,03	999,5	0,0972
	146,8	146,5	146,4	146,57	999,5	0,0969
Среднее значение (X), % Average value (X), %						0,0979
Дисперсия, S^2 Variance, S^2						2,81E-06
Стандартное отклонение, S Standard deviation, S						0,001675
Стандартное отклонение среднего результата, S_0 Standard error, S_0						0,000684
Коэффициент вариации, S_{σ} , % Coefficient of variation, S_{σ} , %						1,711
Доверительный интервал ($P = 0,95$), % Confidence interval ($P = 0,95$), %						0,0961–0,0996

- Терёшкина О. И., Гуськова Т. А., Раменская Г. В., Самылина И. А. Фармакопейные подходы к нормированию остаточных органических растворителей в лекарственных средствах. *Фармация*. 2017;(66)1:9–13.
- Дуденкова М. Е., Грушевская Л. Н., Сергеева М. С. Разработка и валидация методики идентификации и количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;(54)2:49–53. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-2-49-53.
- Петухов А. Е., Петрыкина Е. А., Терёшкина О. И., Раменская Г. В., Антипова О. М., Турашев А. Д., Завьялова Е. Г., Головин А. В., Павлова Г. В., Копылов А. М. Стандартизация субстанции тромбаптаниба по показателю «остаточные органические растворители». *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;(52)4:53–58. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-4-53-58.
- Ластовка А. В., Яковлева Е. Ю., Коллегов В. Ф., Фадеева В. П., Салахутдинов Н. Ф. Определение остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии в субстанции (2r,4r,4ar,7r,8ar)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-

2h-хромен-4-ол, обладающей анальгетической активностью. *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2018;84(9):13–20.

9. Компанцева Е. В., Луценко Д. Н., Ларский М. В. Определение остаточных органических растворителей в новом кардиопротекторном соединении методом газовой хроматографии. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2021;(24)10:52–58.
10. Бутина Е. В., Зайцев С. А., Басевич А. В. Разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в инновационной активной фармацевтической субстанции методом ГЖХ ПИД. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(4):124–128.
11. Гольберт К. А., Вигдергауз М. С. Введение в газовую хроматографию. М.: Химия; 1990. 344 с.

REFERENCES

1. Olefir Yu. V., Sakanyan E. I., Shishova L. I., Senchenko S. P. Pharmacopoeial requirements to the quality of medicinal products. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;(52)11:48–54. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-11-48-54. (In Russ.)
2. Taube A. A., Gilyok M. T., Sakanyan E. I. Methodological approaches to improving the quality of raw medicinal plant materials of the pollen morphology group. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;(55)12:56–60. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-12-56-60. (In Russ.)
3. Nevskaya L. V., Lavrenchik E. I., Zhdanova M. Yu., Fadeykina O. V., Kapitanova V. K. International practice of allergen products standardization. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2017;17(4):222–229. (In Russ.)
4. Olefir Y. V., Sakanyan E. I., Shemeryankina T. B., Senchenko S. P., Zaitsev S. A., Barmin A. V. Standardization of drug substances according to the purity section. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;(52)8:56–60. (In Russ.)
5. Teryoshkina O. I., Guskova T. A., Ramenskaya G. V., Samylina I. A. Pharmacopoeial approaches to rationing residual organic solvents in medicines. *Pharmacy*. 2017;(66)1:9–13. (In Russ.)
6. Dudenkova M. E., Grushevskaya L. N., Sergeeva M. S. Development and validation of methods for identification and quantitative determination of residual organic solvents in the substance of the dipeptide mimetic of nerve growth factor GK-2. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;(54)2:49–53. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-2-49-53. (In Russ.)
7. Petukhov A. E., Petrykina E. A., Tereshkina O. I., Ramenskaya G. V., Antipova O. M., Turashev A. D., Zav'yalova E. G., Golovin A. V., Pavlova G. V., Kopylov A. M. Standardization of thrombaptanib drug substance for residual organic solvents. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;(52)4:53–58. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-4-53-58. (In Russ.)
8. Lastovka A. V., Yakovleva E. Yu., Kollegov V. F., Fadeeva V. P., Salakhutdinov N. F. Chromatographic determination of residual organic solvents in (2r,4r,4ar,7r,8ar)-4,7-dimethyl-2-(thiophen-2-yl)octahydro-2h-chromen-4-ol which exhibits high analgesic activity. *Zavodskaya Laboratoriya. Diagnostika Materialov*. 2018;84(9):13–20. (In Russ.)
9. Kompantseva E. V., Lutsenko D. N., Larsky M. V. Determination of residual organic solvents in a new cardioprotective compound by gas chromatography. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2021;(24)10:52–58. (In Russ.)
10. Butina E. V., Zaitsev S. A., Basevich A. V. Development and validation of method of quantitative determination of residual organic solvents in innovative active pharmaceutical ingredient with GC-FID. *Drug development & registration*. 2016;(4):124–128. (In Russ.)
11. Holbert K. A., Wigdergauz M. S. Introduction to Gas Chromatography. Moscow: Khimiya; 1990; 344 p. (In Russ.)

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-169-173>
УДК 616.894-053.8:577.112-092.4



Оригинальная статья / Research article

Модуляция активности rage и CD147 при церебральной амилоидной ангиопатии *in vitro*

А. И. Мосягина¹✉, Е. Б. Бойцова², Е. Д. Хилажева¹, Е. А. Тепляшина¹,
А. В. Моргун¹, А. Б. Салмина^{1,3}

¹ ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, 660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1

² Красноярское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Краевая клиническая больница», 660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3а

³ ФГБНУ «Научный центр неврологии», 125367, Россия, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 80

✉ Контактное лицо: Мосягина Ангелина Ивановна. E-mail: angelina.mosiagina@gmail.com

ORCID: А. И. Мосягина – <https://orcid.org/0000-0002-7344-7925>; Е. Б. Бойцова – <https://orcid.org/0000-0003-1292-3526>; Е. Д. Хилажева – <https://orcid.org/0000-0002-9718-1260>;
Е. А. Тепляшина – <https://orcid.org/0000-0001-7544-3779>; А. В. Моргун – <https://orcid.org/0000-0002-9644-5500>; А. Б. Салмина – <https://orcid.org/0000-0003-4012-6348>.

Статья поступила: 18.03.2022

Статья принята в печать: 25.04.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. В рамках изучения болезни Альцгеймера (БА) все большую актуальность приобретает проблема причинно-следственной связи между нейродегенеративными изменениями и сопровождающей их амилоидной ангиопатией. Накопленный багаж клинических данных указывает на то, что в патогенез БА важный вклад вносят нарушения со стороны нейроваскулярной единицы, в том числе нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), микроциркуляции, метаболического сопряжения клеток.

Цель. Изучение молекулярных механизмов нарушения церебральной микроциркуляции и структурно-функциональной целостности ГЭБ в экспериментальных моделях БА *in vitro* при модуляции активности CD147 и RAGE.

Материалы и методы. Исследование провели на мышах линии C57BL/6 с формированием у животных модели БА *in vivo*. Далее произвели изоляцию и культивирование первичных клеток головного мозга, модуляцию активности CD147 и RAGE в клетках эндотелия *in vitro* с помощью siRNA CD147, siRNA RAGE, циклофилина А и Aβ1-42 и сформировали модель ГЭБ *in vitro*. В модели ГЭБ *in vitro* оценили трансэндотелиальное электрическое сопротивление. В культурах эндотелиальных клеток оценили относительное количество молекул-маркеров ангиогенеза и экспрессию гена APP. Статистическую обработку полученных результатов провели методами непараметрической статистики с помощью критерия Манна – Уитни для сравнения показателей в независимых выборках и с помощью критерия Уилкоксона для сравнения зависимых выборок. Уровень статистической значимости различий $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. Блокирование экспрессии RAGE привело к статистически значимому увеличению показателей ТЭС, интенсификации ангиогенеза и снижению уровня экспрессии APP. Одновременно с этим, блокирование CD147 хотя и привело к увеличению показателей ТЭС, но также характеризовалось противоречивым действием на неоангиогенез и увеличением экспрессии APP.

Заключение. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что подавление экспрессии RAGE и CD147 в клетках церебральных микрососудов может стать перспективным методом снижения их патологической проницаемости.

Ключевые слова: CD147, RAGE, болезнь Альцгеймера, амилоидная ангиопатия, нейроваскулярная единица, гематоэнцефалический барьер

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

Вклад авторов. А. Б. Салмина придумала и разработала дизайн исследования. А. И. Мосягина, Е. Б. Бойцова, Е. Д. Хилажева, Е. А. Тепляшина осуществляли проведение экспериментов *in vitro*. А. В. Моргун осуществлял обработку полученных данных. А. И. Мосягина осуществляла написание текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-2547.2020.7).

Соответствие принципам этики. Эксперименты на животных проведены в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС) и требованиями приказа Минздрава России № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации». Протокол исследования был одобрен на заседании биоэтической комиссии при локальном этическом комитете ИПО ФГБОУ ВО «КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» (протокол № 3 от 08.10.2018).

Для цитирования: Мосягина А. И., Бойцова Е. Б., Хилажева Е. Д., Тепляшина Е. А., Моргун А. В., Салмина А. Б. Модуляция активности rage и CD147 при церебральной амилоидной ангиопатии *in vitro*. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(2):169–173. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-169-173>

Modulation of Rage and CD147 in Cerebral Amyloid Angiopathy *in vitro*

Angelina I. Mosiagina¹✉, Elizaveta B. Boytsova², Elena D. Khilazheva¹, Elena A. Teplyashina¹,
Andrey V. Morgun¹, Alla B. Salmina^{1,3}

¹ Professor V. F. Voino-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, 1, Partizana Zheleznyaka str., Krasnoyarsk, 660022, Russia

² Regional Government-Owned Publicly Funded Healthcare Institution "Regional Clinical Hospital", 3a, Partizana Zheleznyaka str., Krasnoyarsk, 660022, Russia

³ Brain Research Department, Scientific Center of Neurology, 80, Volokolamskoye shosse, Moscow, 125367, Russia

✉ Corresponding author: Angelina I. Mosiagina. E-mail: angelina.mosiagina@gmail.com

© Мосягина А. И., Бойцова Е. Б., Хилажева Е. Д., Тепляшина Е. А., Моргун А. В., Салмина А. Б., 2022

© Mosiagina A. I., Boytsova E. B., Khilazheva E. D., Teplyashina E. A., Morgun A. V., Salmina A. B., 2022

ORCID: Angelina I. Mosiagina – <https://orcid.org/0000-0002-7344-7925>; Elizaveta B. Boytsova – <https://orcid.org/0000-0003-1292-3526>;
Elena D. Khilazheva – <https://orcid.org/0000-0002-9718-1260>; Elena A. Teplyashina – <https://orcid.org/0000-0001-7544-3779>;
Andrey V. Morgun – <https://orcid.org/0000-0002-9644-5500>; Alla B. Salmina – <https://orcid.org/0000-0003-4012-6348>.

Received: 18.03.2022 Revised: 25.04.2022 Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. In the study of Alzheimer's disease (AD), the cause-and-effect relationship between neurodegenerative changes and the accompanying amyloid angiopathy is becoming increasingly important. The accumulated clinical data indicates that an important contribution to the pathogenesis of AD is made by neurovascular unit dysfunction, including disruption in permeability of the blood-brain barrier (BBB), microcirculation, and metabolic coupling of cells.

Aim. To study the molecular mechanisms of disturbed brain microcirculation and the structural and functional integrity of the BBB in experimental models of AD *in vitro* under the modulation of CD147 and RAGE.

Materials and methods. The study was carried out on C57BL/6 mice. First, we formed an AD model in animals of the experimental group. Then, we isolated and cultured primary cells of the brain, modulated the activity of CD147 and RAGE in endothelial cells using siRNA CD147, siRNA RAGE, cyclophilin A and Aβ1-42, and formed a BBB model *in vitro*. Further, we assessed transendothelial electrical resistance in the BBB model *in vitro*, registered the marker molecules of angiogenesis and analyzed the expression of APP in endothelial cells. Statistical processing of the obtained data was carried out using the methods of nonparametric statistics: the Mann – Whitney U test for comparing independent samples and the Wilcoxon test for comparing dependent samples. The level of statistical significance of differences was $p \leq 0.05$.

Results and discussion. Knockdown of RAGE led to a statistically significant increase in TEER, an intensification of neoangiogenesis, and a decrease in the level of APP expression. At the same time, although CD147 knockdown led to an increase in TEER, it also led to controversial effects on angiogenesis and an increase in APP expression.

Conclusion. Analyzing the data obtained, it can be concluded that RAGE and CD147 silencing in the cells of cerebral microvessels can become a promising method for reducing their pathological permeability.

Keywords: CD147, RAGE, Alzheimer's disease, amyloid angiopathy, neurovascular unit, blood-brain barrier

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. Alla B. Salmina created and developed the design of the study. Angelina I. Mosiagina, Elizaveta B. Boytsova, Elena D. Khilazheva, Elena A. Teplyashina carried out experiments *in vitro*. Andrey V. Morgun carried out the statistical analysis. Angelina I. Mosiagina wrote the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. This work was supported by a grant from the President of the Russian Federation for state support of leading scientific schools of the Russian Federation (NSh-2547.2020.7).

Compliance with the principles of ethics. Animal experiments were carried out in accordance with the principles of humanity set forth in the Directive of the European Community (2010/63/EC) and the requirements of the Order of the Ministry of Health of Russia No. 267 of June 19, 2003 "On Approval of the Rules of Laboratory Practice in the Russian Federation". The study protocol was approved at a meeting of the bioethical commission at the local ethics committee of the Institute of Postgraduate Education of the Krasnoyarsk State Medical University. prof. V. F. Voyno-Yasensky (protocol No. 3 dated 08.10.2018).

For citation: Mosiagina A. I., Boytsova E. B., Khilazheva E. D., Teplyashina E. A., Morgun A. V., Salmina A. B. Modulation of rage and CD147 in cerebral amyloid angiopathy *in vitro*. *Drug development & registration*. 2022;11(2):169–173. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-169-173>

ВВЕДЕНИЕ

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) – это сложенноустроенный гистогематический барьер между кровеносной системой и центральной нервной системой, состоящий из высокоспециализированных типов клеток и их микроокружения [1]. К основным типам клеток относят эндотелиальные клетки, перициты, астроциты и нейроны, которые в совокупности с внеклеточным матриксом формируют нейроваскулярную единицу (НВЕ) [2].

Как известно, болезнь Альцгеймера (БА) характеризуется прогрессирующей гибелью нейронов вследствие накопления внеклеточных отложений бета-амилоида (Aβ) и внутриклеточного фосфорилированного тау-белка [3]. Также, патогенез БА включает развитие окислительного стресса, формирование aberrантных межклеточных коммуникаций, митохондриальную дисфункцию [4]. Однако за по-

следние 20 лет все больше клинических данных указывает на то, что в развитие БА важный вклад вносят нарушения со стороны НВЕ, включающие в себя нарушения проницаемости ГЭБ, микроциркуляции, нейрон-астроглиального метаболического сопряжения и глиоваскулярного контроля над локальным кровотоком [5–7]. Более того, было показано, что патологические изменения сосудистых биомаркеров происходят до развития видимых когнитивных нарушений и обнаружения биомаркеров БА [8].

Таким образом, актуальным вопросом является причинно-следственная связь между нейродегенерацией и амилоидной ангиопатией при БА [9]. В этом контексте наш интерес привлекло возможное взаимодействие между двумя молекулами, активность которых может существенно влиять на продукцию и транспорт Aβ через ГЭБ: CD147, модулятором активности секретазы, генерирующей Aβ из APP (amyloid

precursor protein), белка-предшественника амилоида [10], и RAGE, транспортером Аβ через ГЭБ [11]. Целью данной работы было изучение механизмов нарушения церебральной микроциркуляции и структурно-функциональной целостности ГЭБ в экспериментальных моделях БА *in vitro* при модуляции активности CD147 и RAGE для разработки новых подходов к терапии церебральной амилоидной ангиопатии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование БА *in vivo*

Исследование было проведено на мышах линии C57BL/6, самцах в возрасте 4 месяца. Было сформировано две группы: контрольная ($n = 5$) и опытная ($n = 5$). Мышам опытной группы по стереотаксическим координатам $ML \pm 1,3$ мм, $AP - 2,0$ мм, $DV - 1,9$ мм вводили Аβ1-42 в CA1 зону гиппокампа билатерально по 1 мкл для моделирования БА *in vivo*. Контролем служили ложно оперированные животные после введения PBS, осмолярность 300 ± 20 мОсмоль/кг, $pH = 7,0-7,1$ (ПанЭко, кат. № P060п).

Моделирование ГЭБ *in vitro*

Из головного мозга мышей получали первичные культуры эндотелиальных клеток и нейросферы с их последующей направленной дифференцировкой в астроциты и нейроны. Для формирования модели ГЭБ *in vitro* смесь астроцитов и нейронов помещали на дно культурального планшета, а эндотелиоциты на культуральную вставку (Corning-Costar, США). Смесь клеток культивировали в среде: DMEM + глутамин + FBS, $pH = 6,8-7,5$ (ПанЭко, кат. № K052м/SV30160.03) + пеницилин, 5000 ЕД/мл + стрептомицин, 5000 мкг/мл, – при $37^\circ C$ с $5\% CO_2$.

Модуляция CD147 и RAGE в клетках эндотелия *in vitro*

Было сформировано 5 экспериментальных групп: 1) контроль; 2) siRNA CD147; 3) siRNA RAGE; 4) циклофилин А; 5) Аβ1-42. Для блокировки экспрессии CD147 и RAGE в клетках эндотелия использовали siRNA CD147 (Santa Cruz, sc-36375) и siRNA RAGE (Santa Cruz, sc-35299) по протоколу фирмы-производителя. Для активации экспрессии CD147 использовали мышинный рекомбинантный циклофилин А (Abcam, ab202256), 100 нг/мл, для активации экспрессии RAGE использовали Аβ1-42 (Sigma, A9810), 1 мкМ. Время инкубации – 1 ч.

Оценка трансэндотелиального сопротивления в модели ГЭБ *in vitro*

Для оценки компетентности эндотелиального слоя в модели ГЭБ *in vitro* оценивали параметры трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС) через 1, 2, 4, 6 и 24 ч с использованием эпителиального вольтметра EVOM2 и электрода STX2 (World Precision Instruments, США).

Оценка ангиогенеза в клетках эндотелия *in vitro*

Проводили иммуноцитохимическую регистрацию молекул-маркеров ангиогенеза в эндотелиальных клетках. Использовали первичные антитела к CD34 (Abcam, ab81289) и VEGFR2 (Abcam, ab2349) в рабочем разведении 1:300, время инкубации – 18 ч при $4^\circ C$. Вторичные антитела, меченные флюорохромом Alexa 488 (Invitrogen, A11034), использовали в рабочем разведении 1:500, время инкубации – 2 ч при $37^\circ C$. Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE (Bio-Rad, США).

Оценка экспрессии APP методом ПЦР

Производили оценку экспрессии гена APP в эндотелиальных клетках методом ПЦР в режиме реального времени с помощью наборов «РНК-Экстрен» (НПФ Синтол, кат. № EX-515), «MMLV RT kit» (Евроген, кат. № SK021), qPCRmix-HS (Евроген, кат. № PK145L) согласно протоколам фирм-производителей.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов провели с помощью программы StatPlus Professional, сборка 5.9.8.5/Core v.5.9.33 методами непараметрической статистики. Для сравнения показателей в независимых выборках применяли критерий Манна – Уитни, сравнение зависимых выборок осуществляли с помощью критерия Уилкоксона. Различия принимали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки ТЭС в модели ГЭБ *in vitro*

В контрольной группе блокирование RAGE приводило к статически значимому увеличению показателей ТЭС в первые 4 ч наблюдения с последующим уменьшением к концу суток, а Аβ1-42 не оказал влияния на величину ТЭС (рисунок 1, А). В модели БА *in vitro* блокирование RAGE привело к более стойкому и длительному повышению ТЭС, а Аβ1-42 вызвал уменьшение ТЭС к концу суток (рисунок 1, В). В контрольной группе блокирование CD147 приводило к стойкому снижению уровня ТЭС через 6 ч наблюдения, тогда как циклофилин А вызывал статически значимое повышение величины ТЭС к 6 ч наблюдения (рисунок 1, С). В модели БА *in vitro* блокирование CD147 вызвало значимое увеличение показателей ТЭС в первые 6 ч наблюдения, которое сменилось статически значимым уменьшением к концу суток. Циклофилин А вызвал однонаправленное, но менее интенсивное повышение величины ТЭС (рисунок 1, D).

Результаты оценки ангиогенеза в культурах эндотелиальных клеток

В контрольной группе блокирование RAGE и CD147 и культивирование в присутствии Аβ1-42 привело к увеличению количества VEGFR2-иммунопозитивных клеток.

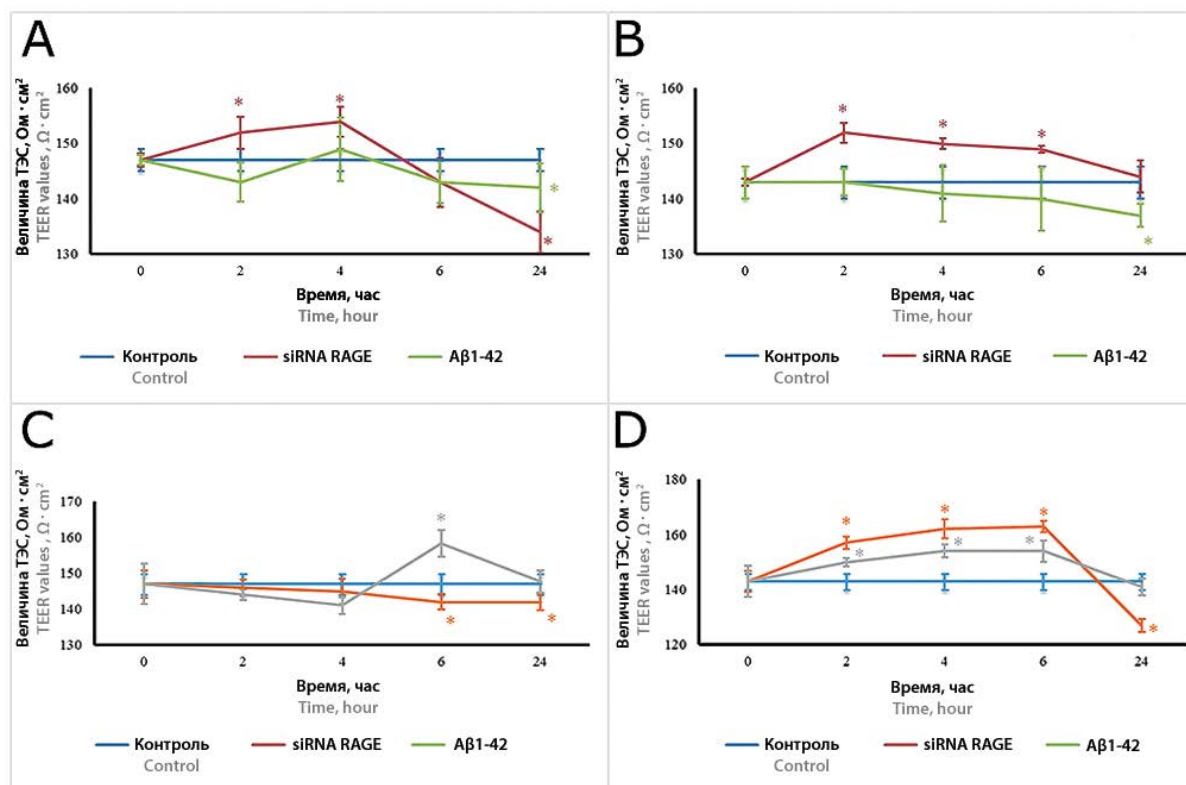


Рисунок 1. Влияние модуляторов RAGE и CD147 на трансэндотелиальное сопротивление в модели гематоэнцефалического барьера *in vitro*.

A, C – контрольные группы; B, D – модель болезни Альцгеймера *in vitro*

Figure 1. Effect of RAGE and CD147 modulators on transendothelial resistance in the blood-brain barrier model *in vitro*.

A, C – control groups; B, D – Alzheimer's disease model *in vitro*

тивных эндотелиоцитов. В группе БА *in vitro* наблюдался противоположный эффект (рисунок 2, A). В группе контроля блокирование RAGE и CD147 привело к увеличению количества CD34-иммунопозитивных эндотелиоцитов. Действие циклофилина A и Aβ1-42 не оказало влияния на экспрессию CD34. В модели БА *in vitro* наблюдалось значимое снижение числа CD34-иммунопозитивных клеток при воздействии Aβ1-42 и siRNA CD147, но увеличение их числа при воздействии циклофилина A (рисунок 2, B).

Результаты оценки экспрессии APP методом ПЦР

В группе БА *in vitro* было зафиксировано увеличение продукции APP в отсутствие модуляторов (рисунок 3). В группах контроля и БА *in vitro* блокирование RAGE привело к статистически значимому снижению экспрессии гена APP, а культивирование в присутствии Aβ1-42 к противоположному эффекту (рисунок 3, A). Блокирование CD147 привело к значимому увеличению экспрессии APP в контроле и БА *in vitro*. Циклофилин A не оказал влияния на экспрессию APP в контроле, однако в модели БА экспрессия APP была статистически значимо выше, чем в контроле (рисунок 3, B).

Анализируя данные оценки ТЭС, можно сделать вывод, что при развитии церебральной амилоидной ангиопатии оправданным будет являться одновременное блокирование экспрессии RAGE и CD147 в клетках церебральных микрососудов. На основании данных об увеличении количества VEGFR2-иммунопозитивных эндотелиоцитов на фоне блокирования RAGE и CD147 можно сделать вывод о супрессивном влиянии указанных молекул на ангиогенез. Таким образом, опираясь на литературные данные о том, что RAGE и CD147 участвуют в продукции амилоида и его транспорте, а также на полученные нами экспериментальные данные о вовлеченности упомянутых молекул в процессы ангио- и барьерогенеза, можно предположить, что одновременное блокирование RAGE и CD147 может стать перспективной тактикой в лечении амилоидной ангиопатии, поскольку будет вовлекать сразу несколько взаимосвязанных звеньев патогенеза БА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые было показано, что не только блокирование RAGE, но и блокирование CD147 может быть эффективно в модели амилоидной ангиопатии *in vitro* для восстановления целостности ГЭБ и увели-

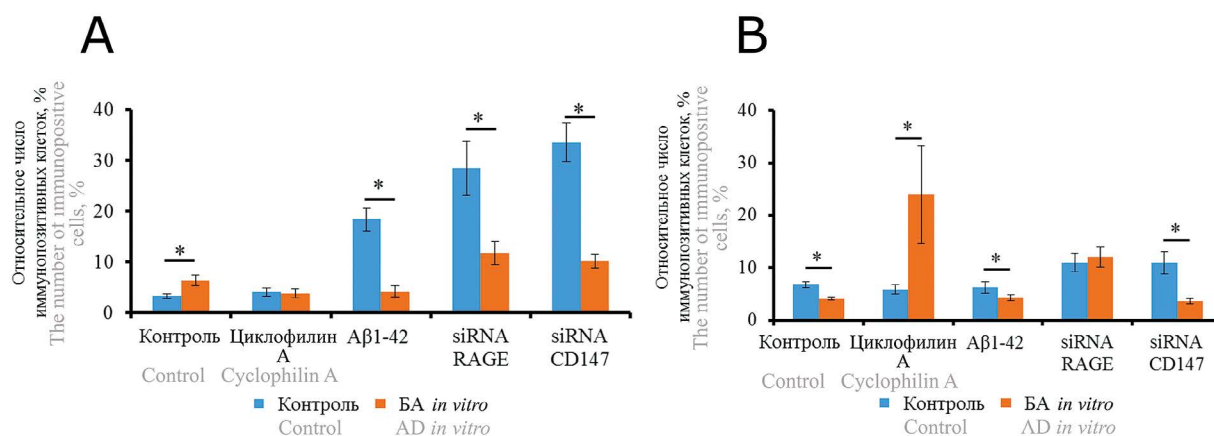


Рисунок 2. Влияние модуляторов RAGE и CD147 на ангиогенез в культурах эндотелиальных клеток.

A – количество VEGFR2-иммунопозитивных клеток; B – количество CD34-иммунопозитивных клеток

Figure 2. Effect of RAGE and CD147 modulators on angiogenesis in endothelial cells.

A – the number of VEGFR2-immunopositive cells; B – the number of CD34-immunopositive cells

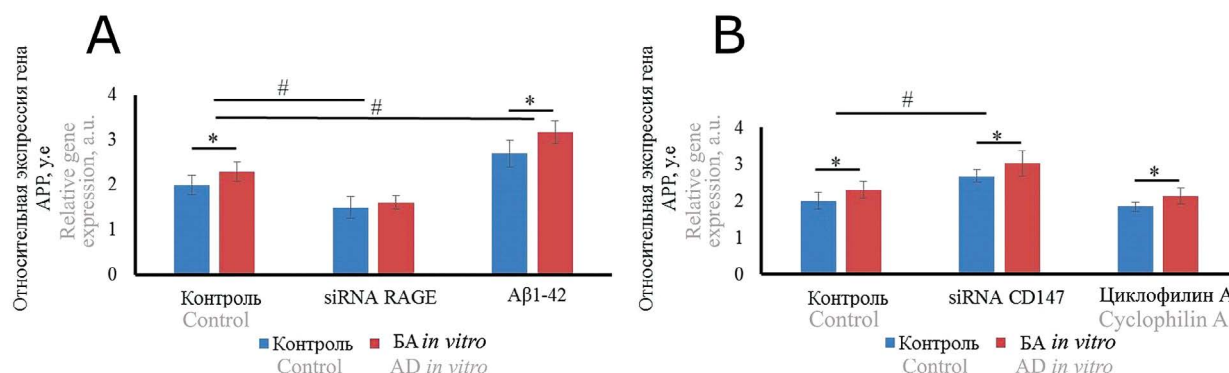


Рисунок 3. Влияние модуляторов RAGE (A) и CD147 (B) на экспрессию гена APP эндотелиальными клетками

Figure 3. Effect of RAGE (A) and CD147 (B) modulators on APP expression in endothelial cells

чения количества клеток с проангиогенным потенциалом. Однако важно отметить, что снижение экспрессии CD147 сопровождается возрастанием продукции APP в клетках церебрального эндотелия и снижением количества CD34 tip cells, активных участников ангиогенеза, маркеров спрутинга.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Langen U. H., Ayloo S., Gu C. Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2019;35:591–613. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062608.
- Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*. 2017;96(1):17–42. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.07.030.
- Gallardo G., Holtzman D. M. Amyloid-β and Tau at the Crossroads of Alzheimer's Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019;1184:187–203. DOI: 10.1007/978-981-32-9358-8_16.
- Graham W. V., Bonito-Oliva A., Sakmar T. P. Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annual Review of Medicine*. 2017;68:413–430. DOI: 10.1146/annurev-med-042915-103753.
- Kisler K., Nelson A. R., Montagne A., Zlokovic B. V. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2017;18(7):419–434. DOI: 10.1038/nrn.2017.48.
- Yamazaki Y., Kanekiyo T. Blood-Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(9):1965. DOI: 10.3390/ijms18091965.
- Liu X., Hou D., Lin F., Luo J., Xie J., Wang Y., Tian Y. The role of neurovascular unit damage in the occurrence and development of Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*. 2019;30(5):477–484. DOI: 10.1515/revneuro-2018-0056.
- Iturria-Medina Y., Sotero R. C., Toussaint P. J., Mateos-Pérez J. M., Evans A. C. Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nature Communications*. 2016;7:11934. DOI: 10.1038/ncomms11934.
- Cisternas P., Taylor X., Lasagna-Reeves C. A. The Amyloid-Tau-Neuroinflammation Axis in the Context of Cerebral Amyloid Angiopathy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(24):6319. DOI: 10.3390/ijms20246319.
- Wang H., Lv J. J., Zhao Y., Wei H. L., Zhang T. J., Yang H. J., Chen Z. N., Jiang J. L. Endothelial genetic deletion of CD147 induces changes in the dual function of the blood-brain barrier and is implicated in Alzheimer's disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2021;27(9):1048–63. DOI: 10.1111/cns.13659.
- Kong Y., Liu C., Zhou Y., Qi J., Zhang C., Sun B., Wang J., Guan Y. Progress of RAGE Molecular Imaging in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2020;12:227. DOI: 10.3389/fnagi.2020.00227.

Study of the role of heparin in regulation of the morphofunctional properties of MSC *in vitro*

Igor K. Norkin¹✉, Kristina A. Yurova¹, Olga G. Khaziakhmatova¹, Elena S. Melashchenko¹, Vladimir V. Malashchenko¹, Egor O. Shunkin¹, Aleksander N. Baikov², Igor A. Khlusov², Larisa S. Litvinova¹

¹ Center of Immunology and Cellular Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, 6, Gaidar str., Kaliningrad, 236041, Russia

² Siberian State Medical University, 2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050, Russia

✉ Corresponding author: Igor K. Norkin. E-mail: norkin_igor@mail.ru

ORCID: Igor K. Norkin – <https://orcid.org/0000-0002-5212-2435>; Kristina A. Yurova – <https://orcid.org/0000-0001-6146-3330>;

Olga G. Khaziakhmatova – <https://orcid.org/0000-0002-5525-3529>; Elena S. Melashchenko – <https://orcid.org/0000-0002-8987-0664>;

Vladimir V. Malashchenko – <https://orcid.org/0000-0003-3437-0926>; Egor O. Shunkin – <https://orcid.org/0000-0003-0326-0409>;

Aleksander N. Baikov – <https://orcid.org/0000-0002-6321-7595>; Igor A. Khlusov – <https://orcid.org/0000-0003-3465-8452>; Larisa S. Litvinova – <https://orcid.org/0000-0001-5231-6910>.

Received: 18.03.2022

Revised: 25.04.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. Artificial materials used in regenerative medicine induce a balanced inflammatory response after implantation, which is an important step for effective regeneration of damaged bone tissue. The contact of the implant with tissues and biological fluids is accompanied by the deposition of blood proteins on its surface, which contributes to the activation of the complement system and initiates blood clotting, leading to the formation of a fibrin clot. On the surface of the implant, fibrin ensures the adhesion of stem cells and their maturation into fibroblasts that produce collagen and its derivatives. The formed extracellular matrix is the basis for the formation of a tissue structure (callus). To prevent the development of postoperative pathological conditions caused by hypercoagulopathy syndrome, therapeutic strategies with anticoagulants such as heparin are used. However, their use limits the formation of a fibrin clot *in vivo*, which may slow down the migration of mesenchymal stromal cells (MSCs) and the subsequent formation of callus.

Aim. To investigate the effect of heparin at pharmacological concentrations on stemness and the ability of MSCs from human adipose tissue to undergo osteogenic differentiation under conditions of *in vitro* cultivation.

Materials and methods. To assess the morphofunctional state of cells cultured in the presence of heparin, 2 experimental groups were formed: 1) MSCs in the presence of heparin at a therapeutic concentration (1.3 IU/ml); 2) MSCs in the presence of heparin at a toxic concentration (13 IU/ml).

Results and discussion. Flow cytometry results showed that the addition of heparin at both concentrations used in the study to MSC culture leads to an increase in the number of cells expressing the surface markers CD73 and CD90, indicating the maintenance of their stem state. On the other hand, a stimulatory effect of heparin at both concentrations used on the transcription of mRNA of osteogenic genes (BMP2, BMP6, ALPL, RUNX2, BGLAP and SMURF1) in MSCs was also observed, which may indicate the osteogenic potential of heparin for the cell culture studied.

Conclusion. The results of the study are useful for regenerative medicine related to the use of MSCs in clinical practice; they may serve as a prerequisite for the development of new therapeutic strategies for orthopedic and traumatologic patients at high risk of postoperative thrombosis after endoprosthetics surgery and osteosynthesis.

Keywords: MSC, heparin, *in vitro*, expression of osteodifferentiation genes, markers of stemness

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 K. Norkin, Kristina A. Yurova and Olga G. Khaziakhmatova adapted, developed and carried out experimental cultivation of MSC. Igor K. Norkin, Elena S. Melashchenko, Vladimir V. Malashchenko and Egor O. Shunkin carried out the research using the instrumental methods presented in the paper and also participated in the creation of a database and statistical processing of the results. Igor K. Norkin, Kristina A. Yurova, Aleksander N. Baikov, Igor A. Khlusov and Larisa S. Litvinova participated in writing the text of the article and its revision. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. State assignment in the field of scientific activity [No. FZWM-2020-0010 to Larisa Litvinova].

Acknowledgment. The authors are grateful to the Siberian State Medical University development program Priority 2030.

For citation: Norkin I. K., Yurova K. A., Khaziakhmatova O. G., Melashchenko E. S., Malashchenko V. V., Shunkin E. O., Baikov A. N., Khlusov I. A., Litvinova L. S. Study of the role of heparin in regulation of the morphofunctional properties of MSC *in vitro*. *Drug development & registration*. 2022;11(2):174–179. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-174-179>

© Norkin I. K., Yurova K. A., Khaziakhmatova O. G., Melashchenko E. S., Malashchenko V. V., Shunkin E. O., Baikov A. N., Khlusov I. A., Litvinova L. S., 2022

© Норкин И. К., Юрова К. А., Хазиахматова О. Г., Мелашченко Е. С., Мелашченко В. В., Шункин Е. О., Байков А. Н., Хлусов И. А., Литвинова Л. С., 2022

Изучение роли гепарина в регуляции морфофункциональных свойств МСК *in vitro*

И. К. Норкин¹✉, К. А. Юрова¹, О. Г. Хазиахматова¹, Е. С. Мелашенко¹, В. В. Малащенко¹,
Е. О. Шункин¹, А. Н. Байков², И. А. Хлусов², Л. С. Литвинова¹

¹ Центр иммунологии и клеточной биотехнологии Балтийского федерального университета им. И. Канта, 236041, Россия, г. Калининград, ул. Гайдара, 6
² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России), 634050, Россия г. Томск, Московский тракт, д. 2

✉ Контактное лицо: Норкин Игорь Константинович. E-mail: norkin_igor@mail.ru

ORCID: И. К. Норкин – <https://orcid.org/0000-0002-5212-2435>; К. А. Юрова – <https://orcid.org/0000-0001-6146-3330>; О. Г. Хазиахматова – <https://orcid.org/0000-0002-5525-3529>;
Е. С. Мелашенко – <https://orcid.org/0000-0002-8987-0664>; В. В. Малащенко – <https://orcid.org/0000-0003-3437-0926>; Е. О. Шункин – <https://orcid.org/0000-0003-0326-0409>;
А. Н. Байков – <https://orcid.org/0000-0002-6321-7595>; И. А. Хлусов – <https://orcid.org/0000-0003-3465-8452>; Л. С. Литвинова – <https://orcid.org/0000-0001-5231-6910>.

Статья поступила: 18.03.2022

Статья принята в печать: 25.04.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Искусственные материалы, применяемые в регенеративной медицине, при имплантации индуцируют развитие сбалансированной воспалительной реакции, что является ключевым этапом для эффективной регенерации поврежденной костной ткани. Контакт имплантата с тканями и биологическими жидкостями сопровождается осаждением белков крови на его поверхности, что способствует активации системы комплемента и инициирует коагуляционный гемостаз, приводящий к образованию фибринового сгустка. На поверхности имплантата фибрин обеспечивает адгезию стволовых клеток, их созревание в фибробласты, продуцирующие коллаген и его производные. Образующийся внеклеточный матрикс лежит в основе формирования тканевой структуры (костной мозоли). Для предотвращения развития постоперационных патологических состояний, вызванных гиперкоагуляционным синдромом, используют терапевтические стратегии с применением антикоагулянтов, таких как гепарин. Однако их использование ограничивает образование сгустка фибрина *in vivo*, что может замедлять миграцию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и последующее формирование костной мозоли.

Цель. Изучение влияния гепарина в фармакологических концентрациях на «стволовость» и способность ММСК жировой ткани человека к остеогенной дифференцировке в условиях культивирования *in vitro*.

Материалы и методы. Для оценки морфофункционального состояния клеток, культивируемых в присутствии гепарина, было сформировано 2 экспериментальные группы: 1) ММСК в присутствии гепарина в терапевтической концентрации (1,3 МЕ/мл); 2) ММСК в присутствии гепарина в токсической концентрации (13 МЕ/мл).

Результаты и обсуждение. По результатам проточной цитометрии было выявлено, что добавление гепарина в обеих используемых в исследовании концентрациях в культуру ММСК приводит к увеличению числа клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры CD73 и CD90, что свидетельствует о сохранении их стволового состояния. С другой стороны, выявлено стимулирующее действие гепарина также в обеих используемых концентрациях на транскрипцию в ММСК мРНК генов остеодифференцировки (BMP2, BMP6, ALPL, RUNX2, BGLAP и SMURF1), что может указывать на остеогенный потенциал гепарина для исследуемой культуры клеток.

Заключение. Результаты исследования полезны для регенеративной медицины, связанной с использованием ММСК в клинической практике; могут служить предпосылкой для разработки новых терапевтических стратегий для пациентов ортопедотравматологического профиля с высоким риском развития послеоперационных тромбозов после проведения эндопротезирования и остеосинтеза.

Ключевые слова: МСК, гепарин, *in vitro*, экспрессия генов остеодифференцировки, маркеры стволовости

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

Вклад авторов. И. К. Норкин, К. А. Юрова и О. Г. Хазиахматова адаптировали, разработали и провели экспериментальное культивирование МСК. И. К. Норкин, Е. С. Мелашенко, В. В. Малащенко и Е. О. Шункин провели исследование с использованием представленных в статье инструментальных методов, а также участвовали в создании базы данных и статистической обработке результатов. В написании текста статьи и ее доработке участвовали И. К. Норкин, К. А. Юрова, А. Н. Байков, И. А. Хлусов и Л. С. Литвинова. В обсуждении результатов участвовали все авторы.

Финансирование. Государственное задание в области научной деятельности [No. FZWM-2020-0010 Литвиновой Ларисы].

Благодарность. Авторы выражают благодарность программе развития СибГМУ «Приоритет 2030».

Для цитирования: Норкин И. К., Юрова К. А., Хазиахматова О. Г., Мелашенко Е. С., Малащенко В. В., Шункин Е. О., Байков А. Н., Хлусов И. А., Литвинова Л. С. Изучение роли гепарина в регуляции морфофункциональных свойств МСК *in vitro*. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(2):174–179. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-174-179>

INTRODUCTION

Implantable artificial materials and structures used in regenerative medicine for osteosynthesis elicit an inflammatory response upon contact with body tissue. The development of local inflammation is a necessary

process for effective regeneration of damaged bone tissue [1]. Contact of the implanted material with the recipient's tissues enhances this process and is accompanied by the deposition of a layer of proteins on its surface that initiate the complement system, components of innate immunity, resulting in the activation of blood

clotting and the formation of a fibrin clot (hematoma) [2]. The protein scaffold is embedded in a negatively charged matrix of sulfated glycosaminoglycans (GAGs) such as heparan sulfate and others, which interact with platelet-derived growth factors, vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor- β (TGF- β). This reduces the sensitivity of growth factors to enzymatic degradation and develops a specific cellular-molecular environment that regulates tissue regeneration [3]. The bone callus, which forms on the surface of the implant and is mainly composed of fibrin, collagen and elastin molecules, provides the basis for the formation of the tissue structure of the bone regenerate through the migration and adhesion of stem cells. The formation of a stable connection between the bone tissue of the recipient bed and the surface of the implant with its further osteointegration occurs [3]. Artificial surfaces activate the hemostasis system and hypercoagulation processes, creating the risk of thromboembolism of the main arteries. To prevent the development of postoperative complications caused by hypercoagulable syndrome, therapeutic strategies with the use of anticoagulant drugs, including anticoagulants (heparin, warfarin) are used [1]. It should be noted that the use of direct anticoagulants (especially heparin) limits the normal formation of a fibrin clot *in vivo*, which slows the migration of mesenchymal stromal cells (MSCs) into the structure of the developing callus and also contributes to the disruption of the processes of osseointegration of implants and osteoreparation. Several research groups report that glycosaminoglycans, especially heparin, are potent co-stimulants of osteogenic signaling pathways. For example, L. Ling et al. (2010) found that heparin activates the Wnt signaling pathway through physical interaction with the Wnt3a ligand, thereby enhancing the differentiation of MSC to osteoblasts [4].

The aim of this study was to investigate the effect of heparin at pharmacological concentrations on the expression of membrane markers of stemness of MSCs in human adipose tissue and their ability to differentiate in the osteogenic direction under *in vitro* culture conditions.

MATERIALS AND METHODS

MSCs were obtained from human lipoaspirate (approval no. 7 dated 12.09.2015 from the local ethics committee of IKBFU Innovation Park) and met the minimum criteria for MSC: cell viability greater than 95 %; adhesion to the surface of the culture plastic; expression of the membrane markers CD105, CD73 and CD90 in combination with minimal expression (≤ 2 %) of CD45/CD34 on the cell surface; the ability to differentiate in three directions (osteogenic, chondrogenic and adipogenic) [5]. To assess the morphofunctional state of cells cultured in the presence of heparin, 2 experimental groups were formed: 1) cultivation of MSC in the presen-

ce of heparin at a therapeutic concentration (1.3 IU/ml); 2) cultivation of MSC in the presence of heparin at a toxic concentration (13 IU/ml). A model of MSC cultivation in a complete culture medium based on DMEM/F12 served as a control. To assess the response of cells in the presence of heparin (Belmedpreparaty, Belarus), MSC (1×10^5 cells/ml) were cultured in sterile 12-well apartment-bottomed plastic plates (Orange Scientific, Belgium) in 2 ml of complete culture medium (PPS) (90 % DMEM/F12 (1:1) (Gibco Life Technologies, USA), 10 % FBS (Sigma Aldrich, USA), 50 mg/l gentamicin (Invitrogen, UK), 280 mg/l L-glutamine (Sigma Aldrich, USA) for 14 days at 37 °C, 100 % humidity, with 5 % CO₂ with a change of medium every 3–4 days. 130-095-198 (Miltenyi Biotec, USA) according to the manufacturer's protocol, after which the cells were analyzed on a MACS Quant flow cytometer (Miltenyi Biotec, Germany). The data were processed using KALUZA Analysis software (Beckman Coulter, USA).

To evaluate the change in mRNA transcription of osteodifferentiation genes (BMP2, BMP6, ALPL, RUNX2, BGLAP and SMURF1), total RNA was isolated from cells using an aqueous solution of phenol and guanidine isothiocyanate (ExtractRNA kit, Evrogen, Russia) according to the manufacturer's protocol and the reverse transcription reaction (MMLV kit, "Evrogen", Russia) was performed. Multiplex PCR analysis with specific TaqMan probes (Beagle, Russia) was performed to determine the relative mRNA expression of the genes. PCR was performed using qPCRMixHS reagents (Evrogen, Russia) and primers at a concentration of 10 pM. 4 μ L of cDNA was used as a template, and the RPLPO gene served as a reference gene. The relative expression of the mRNA genes was determined using the modified Pfaffl formula. Statistical processing of the obtained data was performed using statistical description methods and statistical hypothesis testing methods. The sample was tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Since the data did not follow the law of normal distribution, the median (M), 25 % quartile (Q1) and 75 % quartile (Q3) were determined for descriptive statistics. To evaluate the statistical significance of the differences, the nonparametric Wilcoxon T-test was used for dependent samples and the Mann – Whitney U-test for independent samples. Statistical analysis of the results was performed using the software package Graph Pad Prism version 8.0.1 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, USA). Differences were considered statistically significant at a significance level of $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

MSC's stemness markers

According to the results of flow cytometry, in the cultures with the addition of heparin at a concentration of 13 IU/ml, the content of cells carrying the surface marker CD90 increased by 9 % compared to the control values

Table 1. Expression of surface markers on MSC after 14 days of cultivation with heparin. For each group, the mean characteristics of the sample were calculated: the median (M), the first and third quartiles (Q1 and Q3)

Study groups, n=3	Proportion of living cells, %	CD90 ⁺	CD73 ⁺	CD105 ⁺
Control group (MSC w/o heparin)	80,4 (78,75–84,46)	78,97 (77,56–81,39)	78,22 (74,03–78,97)	17,93 (13,2–23,72)
MSC + heparin 1,3IU/ml	82,08 (80,26–82,58)	79,79 (75,15–85,02)	84,59 (84,24–95,72)*	18,97 (16,36–22,26)
MSC + heparin 13IU/ml	77,57 (64,31–79,13)	87,91 (81,57–88,21)*	87,26 (84,6–88,21)*	34,43 (14,14–35,22)

Note. * Statistical differences ($p \leq 0.05$) compared to the control group according to the Mann – Whitney U test.

($p \leq 0.05$) (Table 1). Moreover, a statistically significant increase in the number of CD73⁺ cells was observed after the addition of heparin at concentrations of 1.3 IU/ml (by 6 %) and 13 IU/ml (by 9 %). In a study by H. Ali et al (2015), an increase in the percentage of cells expressing the markers CD90 and CD73 indicated a poorly differentiated state of the cell culture [6]. In an experiment by Moraes D.A. (2016), a decrease in CD90 expression was associated with osteogenic and adipogenic differentiation of MSCs [7, 8]. CD90 is thought to control the differentiation of MSCs by acting as an obstacle to adherence during differentiation, thus helping to maintain the "stemness" of the cell culture under study [7]. However, there are also data suggesting that the lack of CD90 on the cell surface is associated with a decrease in the expression of proosteogenic factors with a concomitant increase in the expression of inhibitors of differentiation pathways (e.g. the Wnt pathway) [9]. The data obtained in this experiment may indicate a possible role of CD90 as a temporal marker for the early differentiation of MSC in the osteoblastic direction. CD73 has been identified as an underlying mechanism for the conversion of adenosine with its further effect on reducing the excessive reactivity of platelets during the activation of blood coagulation [10]. Thus, cells with CD73 on their surface are able to independently exert an anticoagulant effect. According to

the data obtained, heparin at the concentrations studied (1.3 IU/ml; 13 IU/ml) contributes to a statistically significant increase (compared to the control group; table 1) in the number of CD73⁺ cells in MSC culture. Thus, as a direct anticoagulant, heparin molecules are also able to exert an indirect anticoagulant effect at the cellular level through an increase in the proportion of CD73⁺ MSC cells.

Expression of genes for osteodifferentiation

It was found that the relative mRNA expression of BMP2 and RUNX2 genes remained at the level of control values when heparin was added to the MSC culture at a therapeutic concentration (1.3 IU/ml) (figure 1). At the same time, the anticoagulant at a concentration of 13 IU/ml statistically significantly (3-fold) increased the transcription of their mRNA (figure 1).

W. Jang (2011) showed that BMP2 activates Smad1/5/8 signaling, thereby regulating the transcription of osteogenic genes and initiating the expression of RUNX2 gene mRNA [11]. Therefore, the increase in relative mRNA expression of BMP2 and RUNX2 genes in the presence of heparin at a toxic concentration (13 IU/ml) may indicate the possible involvement of heparin in the early stages of initiation of genes responsible for osteogenic differentiation of MSCs in vitro.

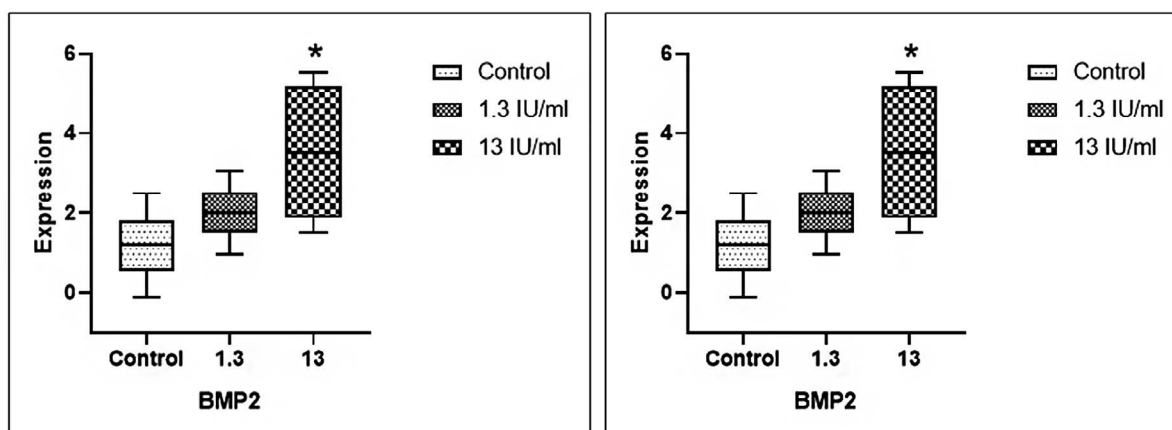


Figure 1. Level of relative expression of mRNA of RUNX2 and BMP2 genes associated with differentiation and maturation of MSC in osteogenic direction after 14 days of cultivation. * Significant differences compared to control cell culture (w/o heparin)

In the experiment, it was found that the addition of heparin at a high dose (13 IU/ml) had no effect on the level of relative expression of mRNA of the genes BMP6 and ALPL compared with the values obtained when the control group was evaluated (figure 2). No statistical differences were found in the level of relative expression of mRNA of BMP6 gene when heparin was added at a concentration of 1.3 IU/ml (figure 2).

It is known that BMP6, together with BMP2, are endogenous regulators of human osteoblast differentiation and play a key role in skeletal development [12]. Although statistical analysis did not reveal significant differences compared to control, there is a tendency for an increase in BMP6 mRNA transcription (figure 2). The authors of numerous studies reported a more significant role of BMP6 in the induction of osteogenic differentiation in vitro compared to the effect of BMP2 [13]. Moreover, J. Z. Li et al (2003) demonstrated that the induction of alkaline phosphatase by BMP6 adenoviruses was higher than that by BMP2 adenoviruses [14].

In turn, heparin at a therapeutic concentration (1.3 IU/ml) statistically significantly increased the level of relative expression of ALPL gene mRNA compared to the values obtained when the control group was evaluated. ALPL induction, ALPL mRNA level and alkaline phosphatase activity (ALP) are considered reliable predictors of MSC differentiation into osteoblasts and the ability to form bone tissue [15].

Figure 3 shows that the addition of heparin at a high dose (13 IU/ml) resulted in a statistically significant increase in the expression of the mRNA of the BGLAP gene. BGLAP or osteocalcin is a small conserved extracellular matrix protein lacking collagen that is expressed during late osteoblast differentiation and is abundant in bone tissue. The function of osteocalcin is related to bone mineralization and synthesis of mineralized extracellular matrix [16]. S. Kannan showed that an increase in the expression of the mRNA of the BGLAP gene is associated with the readiness of cells for osteogenic differentiation, which was further confirmed by the early appearance of preosteoblastic cells in this

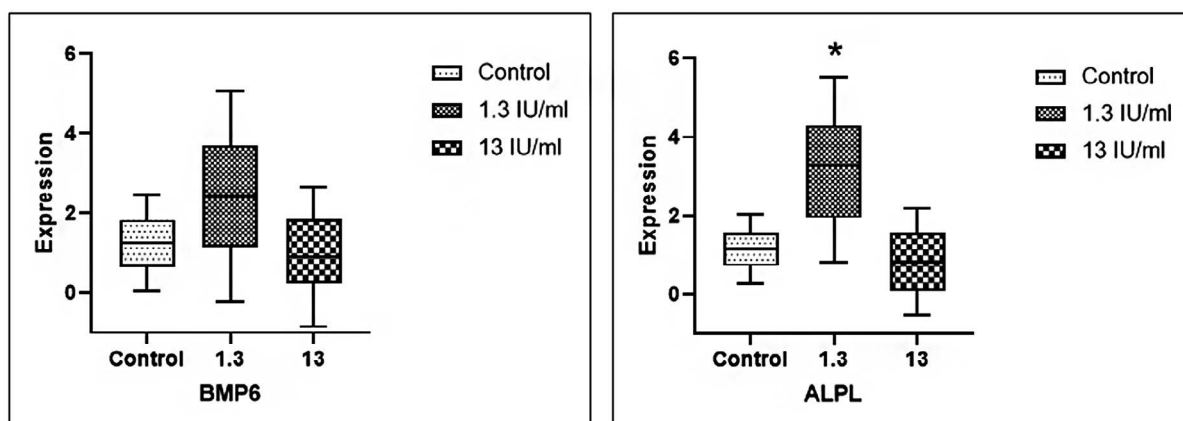


Figure 2. Level of relative expression of mRNA of BMP6 and ALPL genes associated with differentiation and maturation of MSC in osteogenic direction after 14 days of cultivation. * Significant differences compared to control cell culture (w/o heparin)

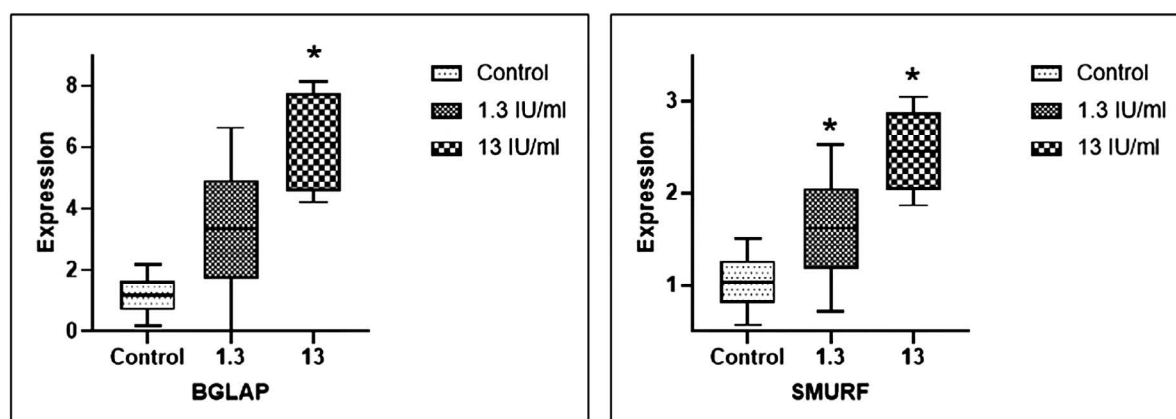


Figure 3. Level of relative expression of mRNA of BGLAP and SMURF1 genes associated with differentiation and maturation of MSC in osteogenic direction after 14 days of cultivation. * Significant differences compared to control cell culture (w/o heparin)

study [16]. The level of SMURF1 gene mRNA expression increased statistically significantly when heparin was added to the MSC culture at both therapeutic (1.3 IU/ml) and toxic (13 IU/ml) concentrations. It should be noted that the expression of SMURF1 gene mRNA was higher when heparin was added at a toxic concentration (figure 3). In 2003, L. Xing first described the function of SMURF1 in RUNX2 degradation and osteoblast function. He showed that overexpression of the mRNA of this gene induces proteasomal degradation of SMAD1 and RUNX2 proteins in osteoblast progenitor cells. Moreover, SMURF1 was shown to be the first E3 ligase identified in the BMP pathway as a negative regulator of bone cell function [17]. We mean here that the increased expression of SMURF1 gene mRNA is directly dependent on the increased expression of RUNX2 gene mRNA. Thus, negative regulation of MSC differentiation towards osteoblasts was induced in cells.

Thus, heparin at a therapeutic dose (1.3 IU/ml) significantly stimulates the expression of ALPL and SMURF1 of the MSC osteodifferentiation genes in vitro. In turn, the osteomodulatory effect of a high concentration of the anticoagulant (13 IU/ml) is evident with respect to the expression of BMP2, RUNX2, BGLAP and SMURF1 genes (figure 1–3). The differential epigenetic effect of different doses of anticoagulant molecules remains to be deciphered.

CONCLUSION

The addition of heparin to the MSC culture of human adipose tissue in vitro leads to an increase in the percentage of CD90⁺ cells (at a concentration of 13 IU/ml) and CD73⁺ cells (at concentrations of 1.3 IU/ml and 13 IU/ml) after 14 days. These results may indicate the stimulatory effect of heparin on the maintenance of the stem state of the MSC culture with the readiness of the cells to differentiate in the osteoblastic direction. It should be noted that heparin can exert an independent anticoagulant effect in MSC culture by increasing the number of CD73⁺ cells.

In general, heparin showed a stimulatory effect on the expression of mRNA of various osteodifferentiation genes at both therapeutic (1.3 IU/ml) and high (13 IU/ml) concentrations. At the same time, a dose-dependent increase in mRNA expression of the SMURF1 gene was observed at both doses of heparin. This gene encodes an E3 ubiquitin-protein ligase that promotes the degradation of RUNX2, which may indicate a transitional state of the MSC culture between the stem state and readiness for osteogenic differentiation.

The data we obtained argue for the complex relationships between the coagulation and anticoagulation systems in the formation of hematomas and the regulation of the processes of osteodifferentiation of MSC. In this regard, the results are interesting for regenerative medicine technologies. On the other hand, they should

be taken into account in postoperative treatment of patients with a high risk of postoperative thrombosis in arthroplasty of large joints and osteosynthesis of fractures.

REFERENCES

1. Labarrere C.A., Dabiri A.E., Kassab G.S. Thrombogenic and Inflammatory Reactions to Biomaterials in Medical Devices. *Frontiers in Bioengineering and biotechnology*. 2020;8:23. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00123.
2. Gorbet M.B., Sefton M.V. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. 2004;25(26):5681–5703. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.023.
3. Chen Q. Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) by modulating assembly of latent TGF-beta-binding protein-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(36):26418–26430. DOI: 10.1074/jbc.M703341200.
4. Ling L. Synergism between Wnt3a and Heparin Enhances Osteogenesis via a Phosphoinositide 3-Kinase/Akt/RUNX2 Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(34):26233–26244. DOI: 10.1074/jbc.M110.122069.
5. Christodoulou I., Goulielmaki M., Devetzi M., Panagiotidis M., Koliakos G., Zoumpourlis V. Mesenchymal stem cells in preclinical cancer cytototherapy: a systematic review. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018;9(336). DOI: 10.1186/s13287-018-1078-8.
6. Ali H., Al-Yatama M. K., Abu-Farha M., Behbehani K., Al Madhoun A. Multi-Lineage Differentiation of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells Mediates Changes in the Expression Profile of Stemness Markers. *PLoS One*. 2015;10(4). DOI: 10.1371/journal.pone.0122465.
7. Moraes D.A. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2016; 7. DOI: 10.1186/s13287-016-0359-3.
8. Sun Q., Nakata H., Yamamoto M., Kasugai S., Kuroda S. Comparison of gingiva-derived and bone marrow mesenchymal stem cells for osteogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2019;23(11):7592–7601. DOI: 10.1111/jcmm.14632.
9. Picke A. K. Thy-1 (CD90) promotes bone formation and protects against obesity. *Science Translational Medicine*. 2018;10(453). DOI: 10.1126/scitranslmed.aao6806.
10. Netsch P. Human mesenchymal stromal cells inhibit platelet activation and aggregation involving CD73-converted adenosine. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018;9(1):184. DOI: 10.1186/s13287-018-0936-8.
11. Jang W. G. BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2-mediated Atf6 gene transcription. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(2):905–915. DOI: 10.1074/jbc.M111.253187.
12. Ye F. The role of BMP6 in the proliferation and differentiation of chicken cartilage cells. *PLoS One*. 2019;14(7). DOI: 10.1371/journal.pone.0204384.
13. Cai C., Wang J., Huo N., Wen L., Xue P., Huang Y. Msx2 plays an important role in BMP6-induced osteogenic differentiation of two mesenchymal cell lines: C3H10T1/2 and C2C12. *Regenerative Therapy*. 2020;14:45–251. DOI: 10.1016/j.reth.2020.03.015.
14. Li J. Z. Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat. *Gene therapy*. 2003;10(20): 1735–1743. DOI: 10.1038/sj.gt.3302075.
15. Ofiteru A. M. Qualifying Osteogenic Potency Assay Metrics for Human Multipotent Stromal Cells: TGF-β2 a Telling Eligible Biomarker. *Cells*. 2020; 9(12): 2559. DOI: 10.3390/cells9122559.
16. Kannan S., Ghosh J., Dhara S. K. Osteogenic differentiation potential of porcine bone marrow mesenchymal stem cell subpopulations selected in different basal media. *Biology Open*. 2020;9(10). DOI: 10.1242/bio.053280.
17. Zhu B., Xue F., Zhang C., Li G. LMCD1 promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stem cells by regulating BMP signaling. *Cell Death & Disease*. 2019;10(9):647. DOI: 10.1038/s41419-019-1876-7.

Изучение фармакокинетики препарата «КОВИД-глобулин» (специфический иммуноглобулин человека против COVID-19) (АО «Нацимбио», Россия) в рамках фазы I клинического исследования

Т. И. Смолянова¹, Н. С. Багаева²✉, М. А. Колганова², И. Е. Шохин², А. М. Николаева³,
Т. В. Вязникова³, А. А. Панкратова³, Е. А. Быкова³

¹ АО «Нацимбио», 127473, Россия, г. Москва, 2-й Волконский пер., д. 10

² ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

³ АО «НПО «Микроген», 127473, Россия, г. Москва, 2-й Волконский пер., д. 10

✉ Контактное лицо: Багаева Наталья Сергеевна. E-mail: n.bagaeva@cpha.ru

ORCID: Т. И. Смолянова – <https://orcid.org/0000-0002-2934-3002>; Н. С. Багаева – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>; М. А. Колганова – <https://orcid.org/0000-0003-4568-1172>;
И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; А. М. Николаева – <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>; Т. В. Вязникова – <https://orcid.org/0000-0003-0497-9757>;
А. А. Панкратова – <https://orcid.org/0000-0001-6442-1347>; Е. А. Быкова – <https://orcid.org/0000-0003-2500-6436>.

Статья поступила: 25.03.2022

Статья принята в печать: 13.05.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Коронавирусная инфекция – острое вирусное заболевание с преимущественным поражением верхних дыхательных путей, вызванное РНК-содержащим вирусом семейства *Coronaviridae*. Вместе с тем известно, что нейтрализующие антитела играют важную роль в противовирусной терапии, поскольку они эффективно ингибируют размножение вирусов и снижают тяжесть заболевания. Поликлональные антитела, содержащиеся в реконвалесцентной плазме, обычно используют в качестве неотложной терапии возникающих инфекционных заболеваний. В этом аспекте применение препарата иммуноглобулина G человека, содержащего специфические антитела к SARS-CoV-2 («КОВИД-глобулин»), представляется более безопасным и эффективным.

Цель. Целью исследования является изучение фармакокинетики препарата «КОВИД-глобулин» (специфический иммуноглобулин человека против COVID-19, раствор для инфузий, не менее 160 антиковидных единиц/мл (АКЕ/мл), АО «НПО Микроген», владелец регистрационного удостоверения АО «Нацимбио») в дополнение к стандартной терапии для лечения пациентов со среднетяжелым течением COVID-19.

Материалы и методы. Клинический и аналитический этапы исследования фармакокинетики препарата «КОВИД-глобулин», а также анализ безопасности и параметров фармакокинетики проводились в рамках клинического исследования изучения безопасности, переносимости и фармакокинетики препарата иммуноглобулина («КОВИД-глобулин»), раствор для инфузий, не менее 160 АКЕ/мл (АО «НПО Микроген», владелец регистрационного удостоверения АО «Нацимбио»). Количественное определение концентраций антител против SARS-CoV-2 проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием спектрофотометрического детектирования в видимом диапазоне спектра на автоматическом планшетном иммуноферментном анализаторе Lazurite (Dynex Technologies Inc., США). Расчет фармакокинетических параметров проводился с помощью пакета Microsoft Excel с расширением для проведения фармакокинетического анализа Boomer (Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, США).

Результаты и обсуждение. В исследовании не зарегистрировано ни одного серьезного нежелательного явления, а единственное нежелательное явление, которое привело к выбыванию добровольца из исследования, не связано с применением препарата. Рассчитаны фармакокинетические параметры исследуемого препарата «КОВИД-глобулин» для двух серий препаратов. Фармакокинетика препарата «КОВИД-глобулин» (содержание антител к SARS-CoV-2 – 330 АКЕ/мл) оценена на выборке из 8 добровольцев. Максимальное значение концентраций специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 составило $25,46 \pm 8,71$ АКЕ/мл. Значение медианы времени достижения максимальной концентрации специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 составило 0,25 часа. Специфические антитела IgG к вирусу SARS-CoV-2 элиминировались из плазмы крови со значением периода полувыведения $266,89 \pm 59,92$ часов. Фармакокинетика препарата «КОВИД-глобулин» (содержание антител к SARS-CoV-2 – 250 АКЕ/мл) оценена на выборке из 15 добровольцев. Максимальное значение концентрации специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 составило $20,93 \pm 3,82$ АКЕ/мл ($\text{Mean} \pm \text{SD}$, где Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение). Значение медианы времени достижения максимального значения концентрации специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 составило 0,25 часа. Специфические антитела IgG к вирусу SARS-CoV-2 элиминировались из плазмы крови со значением периода полувыведения $295,56 \pm 50,68$ часов.

Заключение. По результатам исследования профиль безопасности исследуемого препарата оценивается как благоприятный. По полученным в ходе аналитического этапа исследования значениям концентраций специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 рассчитаны основные фармакокинетические параметры, а также построены усредненные фармакокинетические профили исследуемого вещества после однократного введения препарата «КОВИД-глобулин». Полученные результаты явились основанием для проведения последующих фаз клинических испытаний препарата «КОВИД-глобулин».

Ключевые слова: COVID-19, иммуноглобулин, антитела, плазма, фармакокинетика

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

Вклад авторов. Т. И. Смолянова, А. М. Николаева, Т. В. Вязникова, А. А. Панкратова, Е. А. Быкова участвовали в проведении клинического этапа исследования. М. А. Колганова участвовала в проведении аналитического этапа исследования. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных и расчет фармакокинетических параметров. И. Е. Шохин отвечал за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Смолянова Т. И., Багаева Н. С., Колганова М. А., Шохин И. Е., Николаева А. М., Вязникова Т. В., Панкратова А. А., Быкова Е. А. Изучение фармакокинетики препарата «КОВИД-глобулин» (специфический иммуноглобулин человека против COVID-19) (АО «Нацимбио», Россия) в рамках фазы I клинического исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):180–186. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-180-186>

Phase I pharmacokinetics study of drug «COVID-globulin» (specific human immunoglobulin against COVID-19)

Tatyana I. Smolyanova¹, Natalia S. Bagaeva²✉, Maria A. Kolganova², Igor E. Shohin²,
Alevtina M. Nikolaeva³, Tatyana V. Vyaznikova³, Anastasiya A. Pankratova³, Ekaterina A. Bykova³

¹ JSC "Nacimbio", 10, 2-nd Volkonsky lane, Moscow, 127473, Russia

² LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

³ JSC «NPO "Microgen", 10, 2-nd Volkonsky lane, Moscow, 127473, Russia

✉ Corresponding author: Natalia S. Bagaeva. E-mail: n.bagaeva@cpha.ru

ORCID: Tatyana I. Smolyanova – <https://orcid.org/0000-0002-2934-3002>; Natalia S. Bagaeva – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;

Maria A. Kolganova – <https://orcid.org/0000-0003-4568-1172>; Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>;

Alevtina M. Nikolaeva – <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>; Tatyana V. Vyaznikova – <https://orcid.org/0000-0003-0497-9757>;

Anastasiya A. Pankratova – <https://orcid.org/0000-0001-6442-1347>; Ekaterina A. Bykova – <https://orcid.org/0000-0003-2500-6436>.

Received: 25.03.2022

Revised: 13.05.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. Coronavirus infection is an acute viral disease with a predominant lesion of the upper respiratory tract caused by an RNA-containing virus of the Coronaviridae family. However, it is known that neutralizing antibodies play an important role in antiviral therapy because they effectively inhibit the reproduction of viruses and reduce the severity of the disease. Polyclonal antibodies contained in convalescent plasma are usually used as emergency therapy for emerging infectious diseases. In this aspect, the use of a human immunoglobulin G preparation containing specific antibodies to SARS-CoV-2 ("COVID-globulin") appears to be safer and more effective.

Aim. The aim is pharmacokinetics study of drug "COVID-globulin" (specific human immunoglobulin against COVID-19, solution for infusions, not less than 160 anti-COVID units/mL (ACU/mL), JSC "NPO Microgen", owner of the registration certificate of JSC "Natsibio", Russia), in addition to standard therapy for the treatment of patients with middle-grade COVID-19.

Materials and methods. The clinical and analytical stages of the study of the pharmacokinetics of drug "COVID-globulin", as well as the analysis of the safety and parameters of pharmacokinetics were carried as part of a clinical study of the safety, tolerability and pharmacokinetics of the drug immunoglobulin ("COVID-globulin"), not less than 160 anti-COVID units/mL (ACU/mL), JSC "NPO Microgen", owner of the registration certificate of JSC "Natsibio", Russia. Quantitative determination of antibody concentrations against SARS-CoV-2 was carried out by enzyme-linked immunosorbent assay using spectrophotometric detection in the visible range of the spectrum on an automatic plate enzyme-linked immunosorbent assay analyzer Lazurite (Dynex Technologies Inc., USA). The calculation of pharmacokinetic parameters was carried out using the Microsoft Excel package with an extension for pharmacokinetic analysis Boomer (Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, USA).

Results and discussion. No serious adverse events were reported in the study, and the only adverse event that resulted in a volunteer withdrawing from the study was not related to the use of the drug. The pharmacokinetic parameters of the drug "COVID-globulin" were calculated for two batches of drugs. The pharmacokinetics of the "COVID-globulin" (the content of antibodies to SARS-CoV-2 – 330 ACU/mL) was assessed on a sample of 8 volunteers. The maximum concentration of specific IgG antibodies to the SARS-CoV-2 virus was 25.46 ± 8.71 ACU/mL (Mean $\pm$ SD, where Mean is the arithmetic mean, SD is the standard deviation). The median value of the time to maximum concentration of specific IgG antibodies to the SARS-CoV-2 virus was 0.25 hours. Specific IgG antibodies to the SARS-CoV-2 virus were eliminated from blood plasma with a half-life value 266.89 ± 59.92 hours. The pharmacokinetics of the "COVID-globulin" (the content of antibodies to SARS-CoV-2 – 250 ACU/mL) was assessed on a sample of 15 volunteers. The maximum concentration of specific IgG antibodies to the SARS-CoV-2 virus was 20.93 ± 3.82 ACU/mL. The median value of the time to maximum concentration of specific IgG antibodies to the SARS-CoV-2 virus was 0.25 hours. Specific IgG antibodies to the SARS-CoV-2 virus were eliminated from blood plasma with a half-life value 295.56 ± 50.68 hours.

Conclusion. According to the results of the study, the safety profile of the drug "COVID-globulin" is assessed as favorable. Based on the concentrations of specific IgG antibodies to the SARS-CoV-2 virus obtained during the analytical stage of the study, the main pharmacokinetic parameters were calculated, and the average pharmacokinetic profiles of the test drug "COVID-globulin" were plotted after a single injection. The results obtained were the basis for the subsequent phases of clinical trials of the drug "COVID-globulin".

Keywords: COVID-19, immunoglobulin, antibodies, plasma, pharmacokinetics

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. Tatyana I. Smolyanova, Alevtina M. Nikolaeva, Tatyana V. Vyaznikova, Anastasiya A. Pankratova, Ekaterina A. Bykova participated in the clinical phase of the study. Maria A. Kolganova participated in the analytical phase of the study. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results and calculated of pharmacokinetic parameters. 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: Smolyanova T. I., Bagaeva N. S., Kolganova M. A., Shohin I. E., Nikolaeva A. M., Vyaznikova T. V., Pankratova A. A., Bykova E. A. Phase I pharmacokinetics study of drug «COVID-globulin» (specific human immunoglobulin against COVID-19). *Drug development & registration*. 2022;11(2):180–186. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-180-186>

ВВЕДЕНИЕ

Коронавирусная инфекция – острое вирусное заболевание с преимущественным поражением верхних дыхательных путей, вызванное вирусом, генетический материал которых представлен рибонуклеиновой кислотой (РНК-содержащим), семейства *Coronaviridae* [1]. COVID-19 (от англ. CoronaVirus Disease 2019) – инфекционное заболевание, вызванное последним из открытых вирусов семейства *Coronaviridae* – SARS-CoV-2 [2].

нуклеиновой кислотой (РНК-содержащим), семейства *Coronaviridae* [1]. COVID-19 (от англ. CoronaVirus Disease 2019) – инфекционное заболевание, вызванное последним из открытых вирусов семейства *Coronaviridae* – SARS-CoV-2 [2].

Вспышка COVID-19 переросла в пандемию, охватившую многие страны мира. По данным¹ на 23 января 2022 г. во всем мире зарегистрировано более 346 миллионов случаев заболевания и более 5,5 миллиона случаев с летальным исходом. Эпидемическая ситуация настоятельно требует эффективных, специфических и доступных лекарств [3].

Вместе с тем известно, что нейтрализующие антитела играют важную роль в противовирусной терапии, поскольку они эффективно ингибируют размножение вирусов и снижают тяжесть заболевания [4–6]. Поликлональные антитела, содержащиеся в реконвалесцентной плазме, обычно используют в качестве неотложной терапии возникающих инфекционных заболеваний [7–10].

Согласно рекомендациям ВОЗ, применение плазмы от доноров-реконвалесцентов (лиц с подтвержденным случаем COVID-19 в стадии выздоровления) с целью лечения заболеваний, характеризующихся эпидемическими вспышками и отсутствием специфического лечения, основано на концепции пассивной иммунизации. По опубликованным данным, в КНР и других странах применялась плазма, полученная от доноров-реконвалесцентов COVID-19 (далее антиковидная плазма). На сегодняшний день использование антиковидной плазмы для лечения тяжелых форм COVID-19 включено во временные методические рекомендации² Министерства здравоохранения РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Основная идея этого метода заключается в том, что вместе с плазмой крови пациент получает антитела к вирусу, которые нейтрализуют вирус и активируют иммунную систему больного. Подобная терапия была успешно использована для улучшения выживаемости у пациентов с такими серьезными острыми респираторными синдромами, как SARS и MERS, которые также вызваны коронавирусами. Однако использование нативной плазмы крови всегда сопряжено с риском посттрансфузионных осложнений различного характера, в том числе заражения гемотрансмиссивными инфекциями.

В этом аспекте применение препарата иммуноглобулина G человека, содержащего специфические антитела к SARS-CoV-2 («КОВИД-глобулин»), представляется более безопасным и эффективным.

После получения данных об эффективности и безопасности препарата «КОВИД-глобулин» на животных

было принято решение о проведении I фазы клинического исследования оценки безопасности, переносимости и фармакокинетики при проведении инфузии препарата здоровым добровольцам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинический и аналитический этапы исследования фармакокинетики препарата «КОВИД-глобулин», иммуноглобулин человека, содержащий антитела против SARS-CoV-2, раствор для инфузий, не менее 160 АКЕ/мл (АО «НПО Микроген», владелец регистрационного удостоверения АО «Нацимбио»), а также анализ безопасности и параметров фармакокинетики проводились в рамках клинического исследования изучения безопасности, переносимости и фармакокинетики препарата иммуноглобулина («КОВИД-глобулин»), раствор для инфузий, не менее 160 АКЕ/мл (АО «НПО Микроген», владелец регистрационного удостоверения АО «Нацимбио»).

Клинический этап исследования

В исследовании принимали участие 24 здоровых добровольца в возрасте 18–60 лет.

Для облегчения процедуры проведения инфузии исследуемого препарата и отбора проб крови для фармакокинетического исследования, а также уменьшения дискомфорта добровольца в одну из локтевых вен в первые сутки перед началом инфузии был установлен кубитальный катетер. Далее катетер удаляется не позже чем через 24 часа после окончания введения препарата. Препарат «КОВИД-глобулин» вводили внутривенно-капельно в дозе 4 мл/кг однократно. Начальная скорость введения препарата – от 0,01 до 0,02 мл/кг массы тела в минуту в течение 30 мин. Если препарат хорошо переносился, скорость введения постепенно увеличивалась максимально до 0,12 мл/кг массы тела в минуту. С целью контроля скорости введения препарата инфузия проводится при помощи инфузионного насоса. У каждого добровольца отбиралось 11 проб крови для изучения фармакокинетики: перед введением препарата (–0,25 часа), через 0,25, 6, 12, 24 и 48 часов, через 4, 8, 12, 16, 21 сутки после окончания введения препарата.

Далее образцы крови отбирались в обработанные этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) пробирки типа Vacutainer®, центрифугировались в течение 10 минут при скорости 3000 об/мин. Полученную плазму разделили на 2 равные аликвоты: основную и контрольную. Основные аликвоты плазмы замораживали, хранили и транспортировали в аналитическую лабораторию при температуре не выше минус 20 °С до проведения анализа.

Изучение безопасности

Данные по безопасности анализировались для добровольцев, вошедших в популяцию (24 человека), по следующим показателям: частота возникнове-

¹ Weekly epidemiological update on COVID-19 – 23 January 2022. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---23-january-2022>. Accessed: 23.01.2022.

² Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 14 (27.12.2021)» (утвержденные Министерством здравоохранения Российской Федерации). Доступен по ссылке: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attach/000/059/041/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0_COVID-19_V14_27-12-2021.pdf. Дата обращения: 25.01.2022.

ния нежелательных явлений и серьезных нежелательных явлений, связанных с применением препарата исследования; физикальные данные (измерение показателей температуры тела, артериального давления, частоты сердечных сокращений и дыхательных движений); анализ результатов лабораторных и инструментальных исследований; анализ Дневников наблюдения.

Аналитический этап исследования

Количественное определение концентраций антител против SARS-CoV-2 проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием спектрофотометрического детектирования в видимом диапазоне спектра на автоматическом планшетном иммуноферментном анализаторе Lazurite (Dyner Technologies Inc., США). В основе метода лежит взаимодействие антител против SARS-CoV-2 в анализируемой пробе с иммобилизованным на поверхности полистиролового планшета рекомбинантным структурным белком S1 домен вируса SARS-CoV-2. Связавшиеся антитела выявляют с помощью конъюгата вторичных антител и хромогенной реакции фермента (пероксидаза хрена) с субстратом (тетраметилбензидин). После остановки пероксидазной реакции стоп-регентом измеряют оптическую плотность растворов в лунках на основной длине волны 450 нм и референсной длине волны 630 нм. Интенсивность желтого окрашивания прямо пропорциональна концентрации антител против SARS-CoV-2 в образцах. Для построения калибровочной кривой (график зависимости оптической плотности от концентрации антител против SARS-CoV-2) используется стандартный образец предприятия, разведенный пулированной интактной плазмой крови человека. Концентрацию антител против SARS-CoV-2 в исследуемых образцах определяют непосредственно по этой кривой. В ходе проведения аналитической части исследования использовался набор реагентов Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG) (Euroimmun AG, Германия). Аналитический диапазон составлял 0,01215–0,48600 АЕ/мл.

Статистическая обработка данных и анализ фармакокинетики

Фармакокинетические параметры исследуемого препарата «КОВИД-глобулин» были рассчитаны для двух серий: серию ПЗ (содержание антител к SARS-CoV-2 – 330 АЕ/мл) вводили 8 добровольцам, серию П4 (содержание антител к SARS-CoV-2 – 250 АЕ/мл) вводили 16 добровольцам.

Индивидуальные профили изменения значений концентраций специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 в плазме крови добровольцев во времени, зарегистрированные после введения исследуемого препарата «КОВИД-глобулин», характеризовались максимальным значением концентраций специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 лекарственно-

го средства (C_{max}) и временем его достижения (T_{max}), площадью под кривой «концентрация специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 – время» с момента введения до последнего определяемого значения концентрации специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 во временной точке t (AUC_{0-t}), рассчитанной методом трапеций, площадью под кривой «концентрация специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 – время» с момента введения препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$). Дополнительно определялись следующие фармакокинетические параметры: период полувыведения специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 ($T_{1/2}$); константа скорости элиминации (K_{el}), оцениваемая по угловому коэффициенту линии регрессии, рассчитанного по методу наименьших квадратов, натурального логарифмического значения концентраций специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 по отношению ко времени получения последних значений концентраций специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 выше нижнего предела количественного определения; объем распределения лекарственного средства (V_d).

Расчет фармакокинетических параметров проводился с помощью пакета Microsoft Excel с расширением для проведения фармакокинетического анализа Boomer (Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, США). Распределение фармакокинетических параметров описано мерами центральной тенденции (среднее арифметическое, среднее геометрическое, медиана) и мерой разброса данных (стандартное отклонение, коэффициент вариации, минимальное значение, максимальное значение). Описательная статистика фармакокинетических параметров проводилась с помощью Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Безопасность

В исследовании не зарегистрировано ни одного серьезного нежелательного явления, а единственное нежелательное явление, которое привело к выбыванию добровольца из исследования, не связано с применением препарата.

Фармакокинетические параметры исследуемого препарата «КОВИД-глобулин», серия ПЗ. Фармакокинетика оценивалась на выборке из 8 добровольцев. Максимальное значение концентраций специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 составило $25,46 \pm 8,71$ АЕ/мл (Mean $\pm$ SD, где Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение). Значение медианы времени достижения максимальной концентрации специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 составило 0,25 часа. Значение площади под кривой «концентрация специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 – время» с момента введения до последнего определяемого значения концентрации специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 во временной точке t (AUC_{0-t}) со-

ставило $4970,92 \pm 1642,34$ АКЕ · ч/мл. Значение площади под кривой «концентрация специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 – время» с момента введения препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) составило $6821,64 \pm 2480,07$ АКЕ · ч/мл. Специфические антитела IgG к вирусу SARS-CoV-2 элиминировались из плазмы крови со значением периода полувыведения ($T_{1/2}$) $266,89 \pm 59,92$ часов. Объем распределения лекарственного средства (V_d) соответствует значению $6,40 \pm 3,61$ литров (таблица 1).

Фармакокинетические параметры исследуемого препарата «КОВИД-глобулин», серия П4. Фармакокинетика оценивалась на выборке из 15 добровольцев [один доброволец выбыл из исследования в связи с несвязанным с препаратом исследованием положительным результатом теста на выявление рибонуклеиновой кислоты (РНК) вируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции].

Максимальное значение концентрации специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 составило $20,93 \pm 3,82$ АКЕ/мл. Значение медианы времени достижения максимального значения концентрации специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 составило 0,25 часа. Значение площади под кривой «концентрация специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 – время» с момента введения до последнего определяемого значения концентрации специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 во временной точке t (AUC_{0-t}) составило $4115,43 \pm 686,38$ АКЕ · ч/мл. Значение площади под кривой «концентрация специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 – время» с момента введения препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) составило $6078,10 \pm 1410,08$ АКЕ · ч/мл. Специфические антитела IgG к вирусу SARS-CoV-2 элиминировались из плазмы крови со значением периода полувыведения ($T_{1/2}$) $295,56 \pm 50,68$ часов. Объем распределения лекарственного средства (V_d) соответствует значению $4,47 \pm 0,67$ литров (таблица 1).

Таблица 1. Сводная таблица фармакокинетических параметров после однократного введения дозы исследуемого препарата «КОВИД-глобулин»

Table 1. Summary data of pharmacokinetic parameters after a single dose administration of "COVID-globulin"

Фармакокинетический параметр препарата «КОВИД-глобулин» Pharmacokinetic parameter of "COVID-globulin"	Серия ПЗ Batch P3	Серия П4 Batch P4
C_{max} АКЕ/мл C_{max} АКУ/мл		
Количество Number of volunteers	8	15
Среднее арифметическое Mean	25,46	20,93
Среднее геометрическое Geometric Mean	23,87	20,60
Медиана Median	26,32	20,20
Стандартное отклонение SD	8,71	3,82

Фармакокинетический параметр препарата «КОВИД-глобулин» Pharmacokinetic parameter of "COVID-globulin"	Серия ПЗ Batch P3	Серия П4 Batch P4
Коэффициент вариации CV, %	34,20	18,24
Минимальное значение Min	12,21	14,96
Максимальное значение Max	36,59	27,44
AUC_{0-t} АКЕ · ч/мл AUC_{0-t} АКУ · ч/мл		
Количество Number of volunteers	8	15
Среднее арифметическое Mean	4970,92	4115,43
Среднее геометрическое Geometric Mean	4693,24	4060,82
Медиана Median	5138,37	4055,66
Стандартное отклонение SD	1642,34	686,38
Коэффициент вариации CV, %	33,04	16,68
Минимальное значение Min	2558,40	2978,23
Максимальное значение Max	7226,83	5348,85
$AUC_{0-\infty}$ АКЕ · ч/мл $AUC_{0-\infty}$ АКУ · ч/мл		
Количество Number of volunteers	8	15
Среднее арифметическое Mean	6821,64	6078,10
Среднее геометрическое Geometric Mean	6420,00	5927,80
Медиана Median	6902,60	6162,05
Стандартное отклонение SD	2480,07	1410,08
Коэффициент вариации CV, %	36,36	23,20
Минимальное значение Min	3556,20	3964,35
Максимальное значение Max	11230,43	8723,66
T_{max} ч T_{max} h		
Количество Number of volunteers	8	15
Среднее арифметическое Mean	1,69	0,63
Среднее геометрическое Geometric Mean	0,55	0,31
Медиана Median	0,25	0,25
Стандартное отклонение SD	2,66	1,48
Коэффициент вариации CV, %	157,73	234,42
Минимальное значение Min	0,25	0,25
Максимальное значение Max	6	6

Фармакокинетический параметр препарата «КОВИД-глобулин» Pharmacokinetic parameter of "COVID-globulin"	Серия ПЗ Batch P3	Серия П4 Batch P4
K_{el} ч ⁻¹ K_{el} h ⁻¹		
Количество Number of volunteers	8	15
Среднее арифметическое Mean	0,003	0,002
Среднее геометрическое Geometric Mean	0,003	0,002
Медиана Median	0,002	0,002
Стандартное отклонение SD	0,001	0,001
Коэффициент вариации CV, %	34,90	20,94
Минимальное значение Min	0,002	0,002
Максимальное значение Max	0,004	0,003
$T_{1/2}$ ч $T_{1/2}$ h		
Количество Number of volunteers	8	15
Среднее арифметическое Mean	266,89	295,40
Среднее геометрическое Geometric Mean	260,63	291,51
Медиана Median	288,67	281,53
Стандартное отклонение SD	59,92	50,53

Фармакокинетический параметр препарата «КОВИД-глобулин» Pharmacokinetic parameter of "COVID-globulin"	Серия ПЗ Batch P3	Серия П4 Batch P4
Коэффициент вариации CV, %	22,45	17,10
Минимальное значение Min	188,60	221,19
Максимальное значение Max	341,68	391,31
V_d л V_d L		
Количество Number of volunteers	8	15
Среднее арифметическое Mean	6,40	4,47
Среднее геометрическое Geometric Mean	5,64	4,42
Медиана Median	4,65	4,53
Стандартное отклонение SD	3,61	0,67
Коэффициент вариации CV, %	56,43	14,96
Минимальное значение Min	2,78	3,48
Максимальное значение Max	12,85	5,54

Усредненные фармакокинетические профили (в линейных и полулогарифмических координатах) значений концентраций специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 после введения исследуемого препарата приведены на рисунке 1.

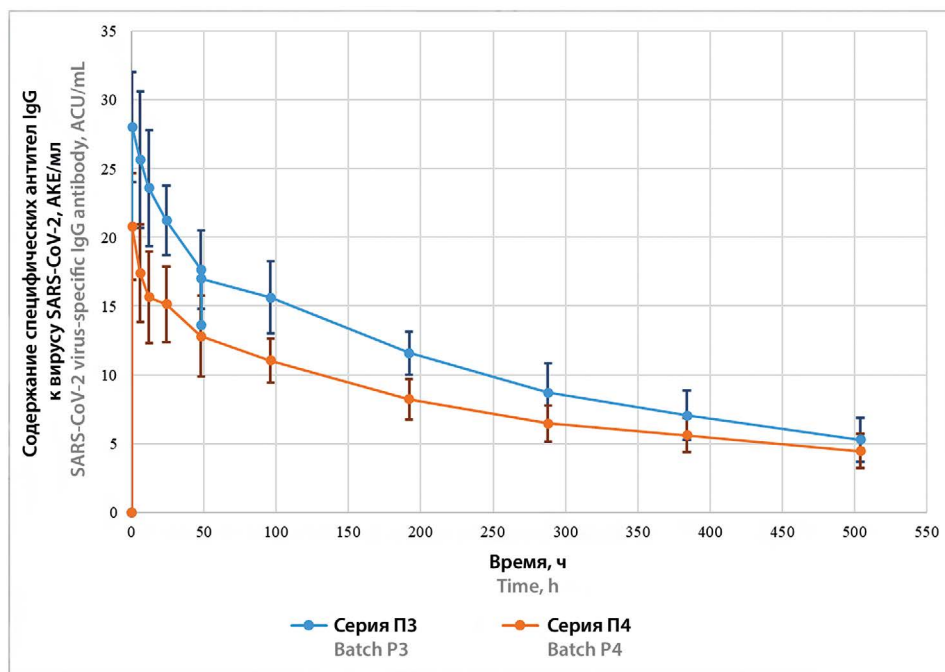


Рисунок 1. Усредненные фармакокинетические профили (в линейных координатах со стандартными отклонениями) специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 после однократного введения дозы исследуемого препарата «КОВИД-глобулин»

Figure 1. Average pharmacokinetic profiles (in linear scale with standard deviations) of SARS-CoV-2 virus-specific IgG antibody after single dose administration of "COVID-globulin"

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено изучение безопасности и фармакокинетики препарата «КОВИД-глобулин» при однократном внутривенном введении в дозе 4 мл/кг с участием здоровых добровольцев.

По результатам исследования профиль безопасности исследуемого препарата был оценен как благоприятный.

По полученным в ходе аналитического этапа исследования значениям концентраций специфических антител IgG к вирусу SARS-CoV-2 были рассчитаны основные фармакокинетические параметры, а также построены усредненные фармакокинетические профили исследуемого вещества после однократного введения препарата «КОВИД-глобулин».

Полученные результаты явились основанием для проведения последующих фаз клинических испытаний препарата «КОВИД-глобулин».

ЛИТЕРАТУРА

1. Никифоров В. В., Суранова Т. Г., Чернобровкина Т. Я., Янковская Я. Д., Бутова С. В. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): клинико-эпидемиологические аспекты. *Архивъ внутренней медицины*. 2020;10(2):87–93. DOI: 10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93.
2. Баклаушев В. П., Кулемзин С. В., Горчаков А. А., Юсубалиева Г. М., Лесняк В. Н., Сотникова А. Г. COVID-19. Этиология, патогенез, диагностика и лечение. *Клиническая практика*. 2020;11(1):7–20. DOI: 10.17816/clinpract26339.
3. Jiang S., Du L., Shi Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):275–277. DOI: 10.1080/22221751.2020.1723441.
4. Corti D., Misasi J., Mulangu S., Stanley D. A., Kanekiyo M., Wollen S., Ploquin A., Doria-Rose N. A., Staupe R. P., Bailey M., Shi W., Choe M., Marcus H., Thompson E. A., Cagigi A., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B., Perez L., Sallusto F., Vanzetta F., Agatic G., Cameroni E., Kitalu N., Gordon I., Ledgerwood J. E., Mascola J. R., Graham B. S., Muyembe-Tamfun J. J., Trefry J. C., Lanzavecchia A., Sullivan N. J. Protective monotherapy against lethal Ebola virus infection by a potentially neutralizing antibody. *Science*. 2016;351(6279):1339–1342. DOI: 10.1126/science.aad5224.
5. Sappapapu G., Fernandez E., Kose N., Cao B., Fox J. M., Bombardi R. G., Zhao H., Nelson C. A., Bryan A. I., Barnes T., Davidson E., Mysorekar I. U., Fremont D. H., Doranz B. J., Diamond M. S., Crowe J. E. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature*. 2016;540(7633):443–447. DOI: 10.1038/nature20564.
6. Hastie K. M., Zandonatti M. A., Kleinfelter L. M., Heinrich M. L., Rowland M. M., Chandran K., Branco L. M., Robinson J. E., Garry R. F., Saphire E. O. Structural basis for antibody-mediated neutralization of Lassa virus. *Science*. 2017;356(6341):923–928. DOI: 10.1126/science.aam7260.
7. Shen C., Wang Z., Zhao F., Yang Y., Li J., Yuan J., Wang F., Li D., Yang M., Xing L., Xiao H., Yang Y., Qu J., Qing L., Chen L., Xu Z., Peng L., Li Y., Zheng H., Chen F., Huang K., Jiang Y., Liu D., Zhang Z., Liu Y., Liu L. Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma. *Journal of American Medical Association*. 2020;323(16):1582–1589. DOI: 10.1001/jama.2020.4783.
8. Brown J. F., Dye J. M., Tozay S., Jeh-Mulbah G., Wohl D. A., Fischer W. A., Cunningham C. K., Rowe K., Zacharias P., Hasselt J., Norwood D. A., Thielman N. M., Zak S. E., Hoover D. L. Anti-Ebola Virus Antibody Levels in Convalescent Plasma and Viral Load After Plasma Infusion in Patients With Ebola Virus Disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 2018;218(4):555–562. DOI: 10.1093/infdis/jiy199.
9. Ankorn M., Gallacher J., Ijaz S., Taha Y., Harvala H., MacLennan S., Thomson E. C., Davis C., Singer J. B., Filipe A. S., Smollett K., Niebel M., Semple M. G., Tedder R. S., McPherson S. Convalescent Plasma Therapy for Persistent Hepatitis E Virus Infection. *Journal of Hepatology*. 2019;71(2):434–438. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.04.008.
10. Ruggiero H. A., Pérez I. F., Milani H. A., Barri A., Val A., Maglio F., Astarloa L., Gonzalez Cambaceres C., Milani H. L., Tallone J. C. Traitement de la fièvre hémorragique argentine par le plasma de convalescent. 4,433 cas [Treatment of Argentine hemorrhagic fever with convalescent's plasma. 4433 cases]. *Presse Medicale*. 1986;15(45):2239–2242.

REFERENCE

1. Nikiforov V. V., Suranova T. G., Chernobrovkina T. Yu., Yankovskaya Y. D., Burova S. V. New Coronavirus Infection (Covid-19): Clinical and Epidemiological Aspects. *The Russian Archives of Internal Medicine*. 2020;10(2):87–93. (In Russ.) DOI: 10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93.
2. Baklaushchev V. P., Kulemzin S. V., Gorchakov A. A., Ysubaliev G. M., Lesnyak V. N., Sotnikova A. G. COVID-19. Etiology, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. *Journal of Clinical Practice*. 2020;11(1):7–20. (In Russ.) DOI: 10.17816/clinpract26339.
3. Jiang S., Du L., Shi Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):275–277. DOI: 10.1080/22221751.2020.1723441.
4. Corti D., Misasi J., Mulangu S., Stanley D. A., Kanekiyo M., Wollen S., Ploquin A., Doria-Rose N. A., Staupe R. P., Bailey M., Shi W., Choe M., Marcus H., Thompson E. A., Cagigi A., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B., Perez L., Sallusto F., Vanzetta F., Agatic G., Cameroni E., Kitalu N., Gordon I., Ledgerwood J. E., Mascola J. R., Graham B. S., Muyembe-Tamfun J. J., Trefry J. C., Lanzavecchia A., Sullivan N. J. Protective monotherapy against lethal Ebola virus infection by a potentially neutralizing antibody. *Science*. 2016;351(6279):1339–1342. DOI: 10.1126/science.aad5224.
5. Sappapapu G., Fernandez E., Kose N., Cao B., Fox J. M., Bombardi R. G., Zhao H., Nelson C. A., Bryan A. I., Barnes T., Davidson E., Mysorekar I. U., Fremont D. H., Doranz B. J., Diamond M. S., Crowe J. E. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature*. 2016;540(7633):443–447. DOI: 10.1038/nature20564.
6. Hastie K. M., Zandonatti M. A., Kleinfelter L. M., Heinrich M. L., Rowland M. M., Chandran K., Branco L. M., Robinson J. E., Garry R. F., Saphire E. O. Structural basis for antibody-mediated neutralization of Lassa virus. *Science*. 2017;356(6341):923–928. DOI: 10.1126/science.aam7260.
7. Shen C., Wang Z., Zhao F., Yang Y., Li J., Yuan J., Wang F., Li D., Yang M., Xing L., Xiao H., Yang Y., Qu J., Qing L., Chen L., Xu Z., Peng L., Li Y., Zheng H., Chen F., Huang K., Jiang Y., Liu D., Zhang Z., Liu Y., Liu L. Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma. *Journal of American Medical Association*. 2020;323(16):1582–1589. DOI: 10.1001/jama.2020.4783.
8. Brown J. F., Dye J. M., Tozay S., Jeh-Mulbah G., Wohl D. A., Fischer W. A., Cunningham C. K., Rowe K., Zacharias P., Hasselt J., Norwood D. A., Thielman N. M., Zak S. E., Hoover D. L. Anti-Ebola Virus Antibody Levels in Convalescent Plasma and Viral Load After Plasma Infusion in Patients With Ebola Virus Disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 2018;218(4):555–562. DOI: 10.1093/infdis/jiy199.
9. Ankorn M., Gallacher J., Ijaz S., Taha Y., Harvala H., MacLennan S., Thomson E. C., Davis C., Singer J. B., Filipe A. S., Smollett K., Niebel M., Semple M. G., Tedder R. S., McPherson S. Convalescent Plasma Therapy for Persistent Hepatitis E Virus Infection. *Journal of Hepatology*. 2019;71(2):434–438. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.04.008.
10. Ruggiero H. A., Pérez I. F., Milani H. A., Barri A., Val A., Maglio F., Astarloa L., Gonzalez Cambaceres C., Milani H. L., Tallone J. C. Traitement de la fièvre hémorragique argentine par le plasma de convalescent. 4,433 cas [Treatment of Argentine hemorrhagic fever with convalescent's plasma. 4433 cases]. *Presse Medicale*. 1986;15(45):2239–2242.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-187-196>
УДК 615.03



Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики определения деферазирока в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ

П. А. Карпова^{1,2}✉, Т. Н. Комаров¹, О. А. Арчакова¹, Д. С. Щелгачева¹,
А. В. Суворова¹, Н. С. Багаева¹, П. К. Карнакова^{1,2}, И. Е. Шохин¹

¹ ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

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

✉ Контактное лицо: Карпова Полина А. E-mail: p.karpova@cpha.ru

ORCID: П. А. Карпова – <https://orcid.org/0000-0001-6777-5976>; Т. Н. Комаров – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; О. А. Арчакова – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>;
Д. С. Щелгачева – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>; А. В. Суворова – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>; Н. С. Багаева – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;
П. К. Карнакова – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>; И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 25.03.2022

Статья принята в печать: 11.05.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Деферазирокс является одним из наиболее известных комплексообразующих лекарственных средств и успешно применяется в хелатирующей терапии для лечения избытка железа в организме человека. Также деферазирокс входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, что свидетельствует о значимости данного лекарственного средства для российского здравоохранения. В указанном перечне присутствуют препараты только зарубежного производителя, поэтому в рамках тенденции к импортозамещению разработка препаратов деферазирока отечественного производства является необходимым и перспективным направлением. В связи с чем возникает необходимость разработки методики, позволяющей с минимальными временными и ресурсными затратами количественно определить деферазирокс в плазме крови человека в рамках фармакокинетического исследования.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики определения деферазирока в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) для дальнейшего исследования фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных препаратов.

Материалы и методы. Определение деферазирока в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-УФ. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков ацетонитрилом. Раствор эрлотиниба использовался в качестве внутреннего стандарта. Подвижная фаза: 0,3%-й раствор ортофосфорной кислоты в воде, доведенный до pH 3,0 (элюент А) и 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). Колонка: Symmetry®, 75 × 4,6 мм (Waters, США). Аналитический диапазон методики для деферазирока: 0,25–70,00 мкг/мл в плазме крови. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора при длине волны поглощения 299 ± 2 нм.

Результаты и обсуждение. Валидация разработанной методики проводилась по следующим валидационным параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность (стабильность исходных и рабочих стандартных растворов аналита и внутреннего стандарта; краткосрочная стабильность; стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналита; долгосрочная стабильность аналита в матрице).

Заключение. Была разработана и валидирована методика определения лекарственного средства деферазирокс в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. Аналитический диапазон методики был подтвержден и составил 0,25–70,00 мкг/мл для деферазирока в плазме крови. Данная методика была использована в рамках проведения исследования фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов деферазирока.

Ключевые слова: деферазирокс, плазма, железо, ВЭЖХ-УФ, валидация, определение, фармакокинетика, биоэквивалентность

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. А. Карпова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. П. К. Карнакова занималась подготовкой проб к анализу. Н. С. Багаева отвечала за статистическую обработку данных. И. Е. Шохин отвечал за организацию исследования. Все вышеуказанные авторы принимали участие в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Карпова П. А., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Суворова А. В., Багаева Н. С., Карнакова П. К., Шохин И. Е. Разработка и валидация методики определения деферазирока в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):187–196. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-187-196>

Development and Validation of a Method for Determining Deferasirox in Human Blood Plasma by HPLC-UV

Polina A. Karpova^{1,2}✉, Timofey N. Komarov¹, Olga A. Archakova¹,
Dana S. Shchelgacheva¹, Alexandra V. Suvorova¹, Natalia S. Bagaeva¹,
Polina K. Karnakova^{1,2}, Igor E. Shohin¹

¹ LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

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

✉ Corresponding author: Polina A. Karpova. E-mail: p.karpova@cpha.ru

© Карпова П. А., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Суворова А. В., Багаева Н. С., Карнакова П. К., Шохин И. Е., 2022

© Karpova P. A., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Suvorova A. V., Bagaeva N. S., Karnakova P. K., Shohin I. E., 2022

ORCID: Polina A. Karpova – <https://orcid.org/0000-0001-6777-5976>; Timofey N. Komarov – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; Olga A. Archakova – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Dana S. Shchelgacheva – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>; Alexandra V. Suvorova – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>; Natalia S. Bagaeva – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>; Polina K. Karnakova – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>; Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 25.03.2022

Revised: 11.05.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. Deferasirox is one of the most well-known complexing drugs chelators and is successfully used in chelating therapy for the treatment of excess iron in the human body. Deferasirox is also included in the list of vital and essential medicines, which indicates the importance of this drug for Russian healthcare. In this document, there are drugs only from a foreign manufacturer, therefore, within the framework of the trend towards import substitution, the development of deferasirox preparations of domestic production is a necessary and promising direction. In this connection, there is a need to develop a method that allows quantifying deferasirox in human blood plasma with minimal time and resource costs as part of a pharmacokinetic study.

Aim. The aim of this study is to develop a method for quantitative determination of deferasirox in human blood plasma by high performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection (HPLC-UV) for further bioequivalence studies.

Materials and methods. Determination of the deferasirox in human blood plasma was carried out by HPLC-UV. The method of proteins precipitation by acetonitrile was used as a sample preparation. Erlotinib solution was used as an internal standard. Mobile phase: 0.3 % solution of orthophosphoric acid in water, brought to pH 3.0 (eluent A) and 0.1 % solution of formic acid in acetonitrile (eluent B). Column was Symmetry®, 75 × 4,6 mm (Waters, США). Analytical range of the technique for deferasirox was 0.25–70.00 µg/ml in human blood plasma. Detection was carried out using a UV detector at an absorption wavelength of 299 ± 2 nm.

Results and discussion. This method was validated by selectivity, calibration curve, accuracy, precision, spike recovery, the lower limit of quantification, carry-over effect and stability.

Conclusion. A method of quantitative determination of deferasirox in human blood plasma was developed and validated by HPLC-UV. The analytical range was 0.25–70.00 µg/ml in human blood plasma. This method was used as part of a study of the pharmacokinetics and bioequivalence of deferasirox drugs.

Keywords: deferasirox, human blood plasma, iron, HPLC-UV, validation, pharmacokinetics, bioequivalence

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. Shchelgacheva, Alexandra V. Suvorova, Polina A. Karpova have developed and validated the analytical method. Polina K. Karnakova participated in sample preparation. Natalia S. Bagaeva conducted statistical processing of the obtained results. 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: Karpova P. A., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Suvorova A. V., Bagaeva N. S., Karnakova P. K., Shohin I. E. Development and validation of a method for determining deferasirox in human blood plasma by HPLC-UV. *Drug development & registration*. 2022;11(2):187–196. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-187-196>

ВВЕДЕНИЕ

Деферазирокс – тридентатный лиганд с высоким сродством к трехвалентному железу, при этом две молекулы лекарственного средства образуют устойчивый комплекс с одним ионом трехвалентного железа (рисунок 1) [1, 2]. Благодаря данным свойствам деферазирокс нашел применение в хелатирующей терапии для лечения β-талассемии, серповидно-клеточной анемии из-за переливания крови и других заболеваний, связанных с избытком железа в крови человека [2–4]. Механизм такой терапии основан на связывании ионов железа и образовании хелатов, которые в последствии выводятся из организма. Стоит также отметить, что деферазирокс показал антиоксидантную активность, вызывая существенное снижение скорости окислительного повреждения тканей организма человека, вызванного избытком таких эссенциальных микроэлементов, как железо и медь, которые являются катализаторами активных

форм кислорода и окислительного повреждения в биологических системах [5, 6].

Максимальная концентрация деферазирокса в плазме ($C_{\max}$) и площадь под фармакокинетической кривой (AUC) зависят от дозы лекарственного средства при приеме перорально, однако время достижения $C_{\max}$ ($T_{\max}$) не зависит от дозы и составляет около 1–2 часов. Среднее значение периода полувыведения ($t_{1/2}$) деферазирокса составляет до 19 часов [2, 7]. Известно, что основным путем метаболизма деферазирокса является конъюгация с глюкуроновой кислотой: ацилглюкуронид и 2-О-глюкуронид [8]. Большая часть (около 84 %) деферазирокса и его метаболитов выводится с желчью через белок множественной лекарственной резистентности 2 [multidrug resistance protein 2 (MRP2)], а остальные 16 % выводятся через белок устойчивости к раку молочной железы [breast cancer resistance protein (BCRP)] и с мочой. Почечная экскреция в виде глюкуронида составляет всего 8 % от введенной дозы лекарственного средства [7, 9, 10].

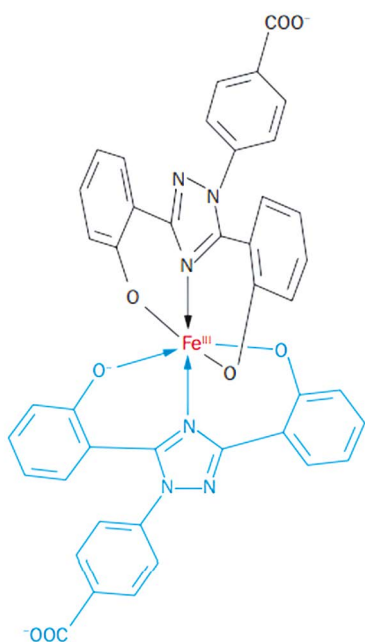


Рисунок 1. Структурная формула комплекса деферазирокса с железом

Figure 1. Chemical structure of deferazirox complex with iron

Деферазирокс входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, что свидетельствует о значимости данного лекарственного средства для российского здравоохранения. В указанном перечне присутствуют препараты только зарубежного производителя, поэтому в рамках тенденции к импортозамещению разработка препаратов деферазирокса отечественного производства является необходимым и перспективным направлением¹.

В настоящее время опубликовано несколько исследований по определению деферазирокса в биологических объектах с целью проведения фармакокинетических исследований. Для определения данного вещества в биологических жидкостях применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)], флуориметрическим детектиро-

ванием (ВЭЖХ-ФЛД) [high performance liquid chromatography – fluorescence detection (HPLC-FLD)] и ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) [high performance liquid chromatography – ultraviolet detection (HPLC-UV)]. В структуре молекулы деферазирокса содержатся несколько хромофорных групп (см. рисунок 1), поэтому в большинстве рассмотренных литературных источников предпочтение отдается в пользу анализа методом ВЭЖХ-УФ.

Во многих рассмотренных методиках в качестве пробоподготовки используется способ осаждения белков ацетонитрилом (ACN) или его смесью с метанолом (MeOH) в различных соотношениях (таблица 1). Также для пробоподготовки используют такие способы как жидкость-жидкостная экстракция с возможной последующей дериватизацией для увеличения флуоресценции аналита или добавление дополнительно некоторого количества фосфатного буфера для перевода деферазирокса в свободную от железа форму, хотя подвижная фаза при таком варианте уже содержит фосфатный буфер с pH 3,0 [11, 12]. Несколько методик определения деферазирокса предполагают добавление некоторого количества этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) для того, чтобы предотвратить образование комплекса лекарственного средства с железом и определить свободную форму аналита. Также стоит отметить, что в этих методиках используется разбавление при подготовке проб для анализа [13, 14]. В других методиках рассматривают в качестве объекта исследований кровь человека или грудное молоко, а не плазму крови человека [14, 15], или время хроматографического анализа достаточно продолжительное [16].

Рассматриваемые выше методики определения деферазирокса проблематичны к реализации на практике в условиях повседневной и рутинной работы из-за трудозатратной пробоподготовки и продолжительности анализа в целом.

В данном исследовании приводится разработка и валидация методики определения деферазирокса в плазме крови человека методом ВЭЖХ с использованием ультрафиолетового детектора. В качестве пробоподготовки используется простой и доступный способ осаждения белков ацетонитрилом, а в качестве элюента А подвижной фазы – фосфатный буфер с pH 3,0, элюента В – 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera-i LC-2040 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенном термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и ультрафиолетовым детектором. Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions Single LC (Shimadzu Corporation, Япония).

¹ Распоряжение Правительства РФ от 12 октября 2019 г. № 2406-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2020 год, перечня лекарственных препаратов для медицинского применения, в том числе лекарственных препаратов для медицинского применения, назначаемых по решению врачебных комиссий медицинских организаций, перечня лекарственных препаратов, предназначенных для обеспечения лиц, больных гемофилией, муковисцидозом, гипофизарным нанизмом, болезнью Гоше, а также минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи». (ред. от 30.03.2022). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_335635/. Ссылка активна на 28.04.2022.

Таблица 1. Методики биоаналитических исследований количественного определения деферазирокса

Table 1. Bioanalytical methods of deferasirox quantitative determination

Аналитический метод Analytical method	Объект анализа Object	Примечания по пробоподготовке Sample preparation's notes	Аналитический диапазон, мкг/мл Analytical range, µg/ml	Ссылка Reference
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма крови человека Human blood plasma	Осаждение ACN с последующим добавлением фосфатного буфера и повторным центрифугированием Protein precipitation with acetonitrile followed by addition of phosphate buffer and repeated centrifugation	0,09970–19,94	[11]
ВЭЖХ-ФЛД HPLC-FLD	Плазма крови человека Human blood plasma	ЖЖЭ с последующей дериватизацией дансилхлоридом Liquid-liquid extraction followed by dansyl chloride derivatization	0,02–2,00	[12]
ВЭЖХ-МС/МС LC-MS/MS	Плазма крови человека Human blood plasma	Осаждение ACN с последующим разбавлением Protein precipitation with acetonitrile followed by dilution	0,04–40,00	[13]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Кровь человека Human blood	Дисперсная жидкость-жидкостная микроэкстракция с последующим разбавлением Dispersive liquid-liquid microextraction followed by dilution	0,20–200,00	[14]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Грудное молоко человека Human breast milk	Осаждение ACN:MeOH (70:30, по объему) с последующим упариванием и дериватизацией Protein precipitation with acetonitrile:methanol (70:30, v/v) followed by evaporation and derivatization	0,01–1,00	[15]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма крови человека Human blood plasma	Осаждение ACN:MeOH (50:50, по объему) Protein precipitation by acetonitrile:methanol (50:50, v/v)	0,078125–40,00	[16]

Реактивы и растворы

В процессе исследования были использованы следующие реактивы:

- ацетонитрил (класс «for HPLC», PanReac, Испания);
- ацетонитрил (класс «х.ч.», ООО «ТД «ХИММЕД», Россия);
- муравьиная кислота (класс «for analysis», PanReac, Испания);
- метанол (класс «х.ч.», ООО «ТД «ХИММЕД», Россия);
- ортофосфорная кислота (класс «х.ч.», ООО «Компонент-Реактив», Россия);
- гидроксид натрия (класс «чистый, фармацевтическое качество», PanReac, Испания);
- вода деминерализованная (класс чистоты I).

Для приготовления исходных и рабочих растворов были использованы субстанции деферазирокса (CTX Life Science Pvt. Ltd., Индия, содержание 100,20 %) и эрлотиниба гидрохлорида (USP reference standard, содержание 99,80 %).

Исходный стандартный раствор деферазирокса готовили путем растворения точной навески субстанции в метаноле класса «х.ч.». Рабочие стандартные растворы были приготовлены путем разведения аликвоты исходного стандартного раствора тем же растворителем в соответствии с таблицей 2.

Для приготовления рабочего стандартного раствора внутреннего стандарта (BC) [internal standard (IS)] эрлотиниба точную навеску стандартного образца эрлотиниба гидрохлорида количественно переносили в мерную колбу и растворяли в ацетонитриле класса «х.ч.».

Таблица 2. Концентрации деферазирокса и ВС в калибровочных образцах и образцах контроля качества

Table 2. Concentrations of deferasirox and IS at calibration levels and quality control samples

Уровень Level	Концентрация деферазирокса, мкг/мл Deferasirox concentration, µg/ml	Концентрация ВС, мкг/мл IS concentration, µg/ml	Примечания Notes
1	0,25	20,00	LLOQ – нижний предел количественного определения LLOQ – lower limit of quantification
2	0,50		
3	1,00		
4	5,00		
5	10,00		L – низкий уровень концентрации L – low level of concentration
6	30,00		
7	60,00		M1 и M2 – средние уровни концентраций M1 and M2 – middle levels of concentration
8	70,00		
LLOQ	0,25		H – высокий уровень концентрации H – high level of concentration
L	0,75		
M1	21,00		
M2	42,00		
H	56,00		

Образцы интактной плазмы, исходные и рабочие стандартные растворы хранили в морозильной камере при температуре от -50°C до -35°C .

Пробоподготовка

К 200 мкл образца (калибровочного образца, образца контроля качества и образца интактной плазмы крови), помещенным в центрифужные микропробирки типа «Эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора ВС, затем прибавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 5–10 секунд, затем в течение 15 минут центрифугировали с ускорением 15 000 g. Далее супернатант переносили в хроматографические флаконы и помещали в лотки автосамплера хроматографа.

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: Symmetry®, 75 × 4,6 мм (Waters, США).
- Предколонка: Phenomenex SecurityGuard™. Cartridges Wiperex C18 4 × 3,0 мм.
- Температура термостата: 40 °C.
- Подвижная фаза: 0,3%-й раствор ортофосфорной кислоты в воде, доведенный до pH 3,0 (элюент А); 0,1%-й муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему) (элюент В).
- Скорость потока подвижной фазы: 1,0 мл/мин.
- Градиент состава подвижной фазы представлен на рисунке 2.
- Объем вводимой пробы: 10 мкл.
- Время удерживания деферазирокса: около 3,8 мин.
- Время удерживания эрлотиниба: около 3,2 мин.
- Время регистрации хроматограммы: 0,0–7,0 мин.
- Детектирование: УФ-детектор при длине волны поглощения 299 ± 2 нм.
- Частота регистрации сигнала детектора: 5 Гц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Во время разработки методики возник ряд особенностей: влияние металлов в хроматографической системе на результаты исследования, разница в определении лекарственного средства в плазме между его свободной и хелатной формами, влияние гидролиза хелата деферазирокса с железом под действием кислотных и щелочных агентов, подбор подвижной фазы и подходящего ВС. После проведения ряда экспериментов было выявлено отсутствие влияния на результат исследования системного железа из оборудования. Использование в качестве подвижной фазы 0,3%-го раствора ортофосфорной кислоты в воде, доведенного до pH 3,0, обеспечивало кислотный гидролиз хелата лекарственного средства с железом и приводило к возможности проведения определения общего деферазирокса в свободной форме. Также за счет наличия в молекуле кислотного центра в данной системе деферазирокс находился в неионизированной форме, что позволило повысить его удерживание на хроматографической колонке и получить на хроматограмме узкий и симметричный пик.

В качестве осадителя был использован ацетонитрил, так как он обеспечивал наиболее полное осаждение белков плазмы крови и оптимальную форму хроматографических пиков. Несмотря на то, что в литературных источниках приводятся другие способы пробоподготовки, выбранный способ позволил облегчить процесс и получить методику, соответствующую актуальным требованиям нормативной документации. Для определения исследуемого лекарственного средства и ВС использовался ультрафиолетовый детектор, который позволял получить пики деферазирокса и эрлотиниба за счет наличия хромофорных групп в их строении (таблица 3). В процессе разработки методики, исходя из физико-химических свойств определяемых веществ, была выбрана хроматографическая колонка Symmetry®, 75 × 4,6 мм (Waters, США).

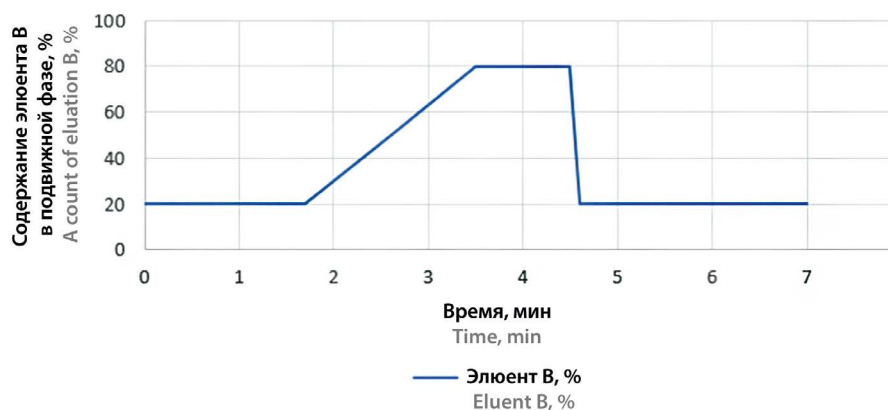
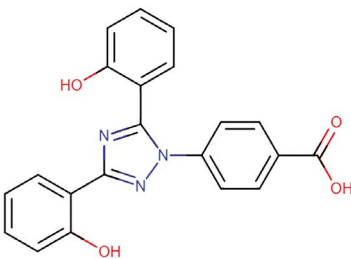
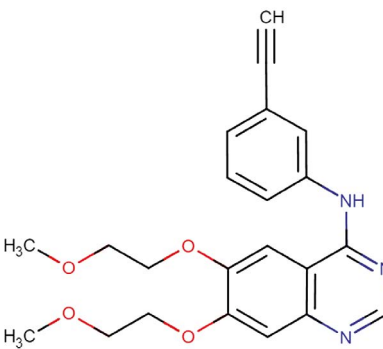


Рисунок 2. Градиент состава подвижной фазы

Figure 2. Elution's gradient

Таблица 3. Физико-химические свойства анализируемого вещества и внутреннего стандарта

Table 3. Chemical and physical characteristics of the analyte and of the IS

Наименование субстанции Name of the substance	Молекулярная масса, г/моль Molecular mass, g/mol	pKa	log P	Структурная формула Chemical formula
Деферазирокс ¹ Deferasirox	373,3615	4,55	4,74	
Эрлотиниб ² Erlotinib	393,4357	16,14	3,2	

Примечание. ¹ Deferasirox. Drugbank. Available to: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01609>. Assessed: 24.02.2022.

² Erlotinib. Drugbank. Available to: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00530>. Assessed: 24.02.2022.

Note. ¹ Deferasirox. Drugbank. Available to: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01609>. Assessed: 24.02.2022.

² Erlotinib. Drugbank. Available to: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00530>. Assessed: 24.02.2022.

Валидация методики

Валидацию методики определения деферазирокса проводили в рамках исследования фармакокинетики в плазме крови человека, руководствуясь правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза¹, а также руководствами FDA² и EMA³ по таким параметрам, как селективность, ка-

¹ Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (утверждены решением № 85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.). Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/456026107>. Ссылка активна на 18.03.2022.

² Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>. Assessed: 18.03.2022.

³ European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>. Assessed: 18.03.2022.

либровочная кривая, точность и прецизионность на уровнях LLOQ, L, M1, M2, H (см. таблицу 2) внутри одного цикла и между циклами, степень извлечения, перенос пробы, нижний предел количественного определения (НПКО) и предел обнаружения, стабильность [стабильность исходных и рабочих стандартных растворов анализируемого вещества и ВС; краткосрочная стабильность («насто́льная» и «пост-препаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке анализируемого вещества; долгосрочная стабильность аналита в матрице].

Селективность

Для оценки данного параметра проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови, 2 образца гиперлипидемической интактной плазмы и 2 образца гемолизной интактной плазмы, полученных из разных источников, а также образцов с прибавлением рабочего стандартного раствора деферазирокса № 1 и рабочего стандартного раствора ВС (см. таблицу 2).

На хроматограммах образцов интактной плазмы крови сигналы пиков, соответствующих временам удерживания деферазирокса и эрлотиниба, не превышали 20 % от сигнала на уровне НПКО и 5 % от сигнала ВС соответственно. Хроматограмма образца интактной плазмы крови приведена на рисунке 3.

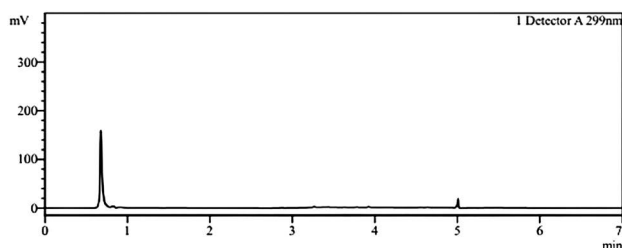


Рисунок 3. Хроматограмма образца интактной плазмы крови
Figure 3. Blank human blood plasma sample chromatogram

Калибровочная кривая

Проводили анализ 8 образцов интактной плазмы крови с добавлением рабочего стандартного раствора эрлотиниба и рабочих стандартных растворов деферазирокса для получения концентраций анализируемого вещества и ВС, соответствующих уровням 1–8 (см. таблицу 2).

По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах «отношение площади пика деферазирокса к площади пика эрлотиниба от отношения концентрации деферазирокса к концентрации эрлотиниба в плазме крови».

Калибровочные графики имели линейную зависимость (рисунок 4). Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости от номинальных значений, не превышали норму не более 20 % для 1 уровня калибровочной кривой и не более 15 % для уровней 2–8.

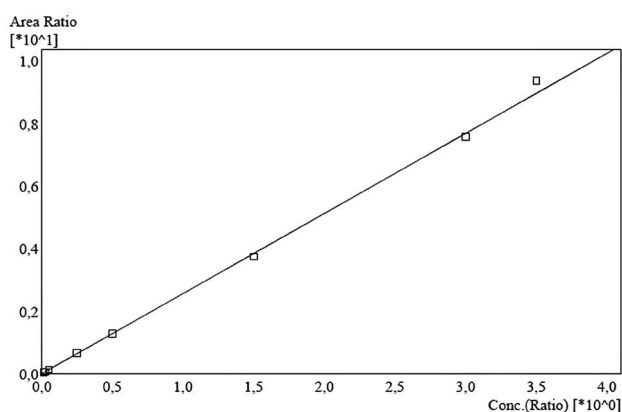


Рисунок 4. Калибровочный график
Figure 4. Calibration curve

Точность и прецизионность

Анализировали калибровочные образцы плазмы крови, соответствующие уровням LLOQ, L, M1, M2, H (см. таблицу 2). Проводили анализ в рамках 3 последовательностей по 5 вводов образца для каждого из 5 уровней концентраций деферазирокса.

Параметр оценивали внутри цикла, между двумя и между тремя циклами. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %). Данные соответствовали нормам (таблица 4).

Таблица 4. Точность и прецизионность методики определения деферазирокса (внутри цикла, между двумя и между тремя циклами)

Table 4. Accuracy and precision of deferasirox determination procedure (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)

Введено (мкг/мл) Injected (µg/ml)	RSD, %			E, %		
	Внутри цикла Inter-day (n = 5)	Между двумя циклами Intra-day 1 (n = 10)	Между тремя циклами Intra-day 2 (n = 15)	Внутри цикла Inter-day (n = 5)	Между двумя циклами Intra-day 1 (n = 10)	Между тремя циклами Intra-day 2 (n = 15)
0,25	0,74	4,60	5,05	7,53	3,19	0,98
0,75	0,26	9,42	8,06	2,17	-6,21	-4,14
21,00	0,34	2,44	3,26	3,77	1,43	3,28
42,00	0,18	0,78	1,90	-1,01	-1,72	-0,50
56,00	0,12	0,43	2,08	-0,22	-0,61	0,80

Степень извлечения

Для оценки степени извлечения (СИ) анализировали по 3 образца, приготовленных из интактной, гемолизной и гиперлипидемической плазмы без влияния степени извлечения на уровнях L, M1, M2 и H (см. таблицу 2), а также образцы контроля качества, приготовленные на различных интактных матрицах, для оценки степени извлечения. Данные представлены в таблице 5. Степень извлечения не должна быть равной 100 %, но необходимо обеспечить эффективное и воспроизводимое извлечение веществ из биологической матрицы. RSD рассчитанных значений степени извлечения анализируемого вещества из биологических матриц не превышало 15 %.

Нижний предел количественного определения

НПКО методики определяли на основании данных калибровочной кривой, точности и прецизионности. За НПКО методики принимались минимальные концентрации деферазирокса в плазме крови в соответствующих аналитических диапазонах, для которых возможно количественное определение деферазирокса со значениями RSD и E не более 20 %. Нижний предел количественного определения методики составил 0,25 мкг/мл.

Таблица 5. Оценка степени извлечения деферазирокса на уровнях L, M1, M2 и H из различных биологических матриц

Table 5. Calculation of deferazirox recovery at L, M1, M2, H levels from the different biological matrix

Биологическая матрица Biological matrix	СИ % Deferazirox recovery %			
	L	M1	M2	H
Интakтная плазма крови Blank human blood plasma	104,07	96,15	97,86	91,90
	104,37	96,53	98,02	92,34
	104,16	96,28	97,50	91,54
Гемолизная плазма крови Hemolyzed blank human blood plasma	110,43	97,35	102,62	92,60
	111,17	98,07	102,46	92,74
	104,28	97,85	102,80	92,43
Гиперлипидемическая плазма крови Lipemic blank human blood plasma	104,52	101,70	100,29	97,94
	101,09	101,70	100,42	97,51
	106,04	101,41	100,03	97,32
Среднее Average	99,60			
S.D.	4,88			
RSD, %	4,90			

Хроматограмма плазмы крови с содержанием деферазирокса на уровне НПКО приведена на рисунке 5.

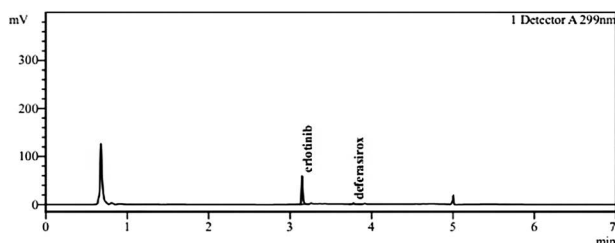


Рисунок 5. Хроматограмма плазмы крови с содержанием деферазирокса на уровне НПКО

Figure 5. Chromatogram of human blood plasma with deferazirox content at the level of LLOQ

Стабильность

Были подтверждены на нижнем (L уровень) и верхнем (H уровень) уровнях концентраций деферазирокса следующие виды стабильности: краткосрочная стабильность («насто́льная» и «постпрепаративная»), стабильность при трехкратной заморозке-разморозке, стабильность исходных и рабочих стандартных растворов деферазирокса и эрлотиниба (при хранении в течение 57 дней при температуре от -50°C до -35°C). Долгосрочная стабильность деферазирокса в составе плазмы крови была оценена в течение 57 дней при хранении при температуре от -50°C до -35°C .

Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочных образцов с наибольшей концентрацией и образцов интактной плазмы на хроматограммах образцов интактной плазмы отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам деферазирокса и ВС.

Применение разработанной методики

На основе разработанной методики был проведен аналитический этап исследования фармакокинетики и биоэквивалентности препарата отечественного производства в виде капсул 360 мг и препарата сравнения Джадену®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой 360 мг (Novartis Pharma AG, Швейцария). На рисунке 6 приведен пример хроматограммы образца плазмы крови добровольца, принимавшего участие в данном исследовании.

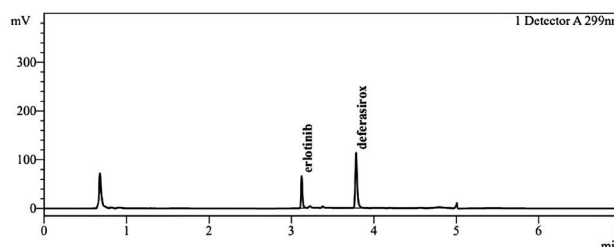


Рисунок 6. Хроматограмма плазмы крови добровольца

Figure 6. Chromatogram of volunteer human blood plasma sample

Индивидуальные профили изменения значений концентраций деферазирокса в плазме крови человека во времени (t), зарегистрированные после приема исследуемого препарата и препарата сравнения, характеризовались максимальной концентрацией лекарственного вещества, площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного средства до последней определяемой концентрации во временной точке t , выше НПКО (AUC_{0-t}), площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного средства до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$).

В таблице 6 приведены значения средних арифметических и средних геометрических для фармакокинетических параметров C_{max} , AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ препаратов исследования.

Фармакокинетические профили исследуемого препарата отечественного производства и препарата сравнения Джадену® приведены на рисунке 7.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения деферазирокса в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. Подтвержденный

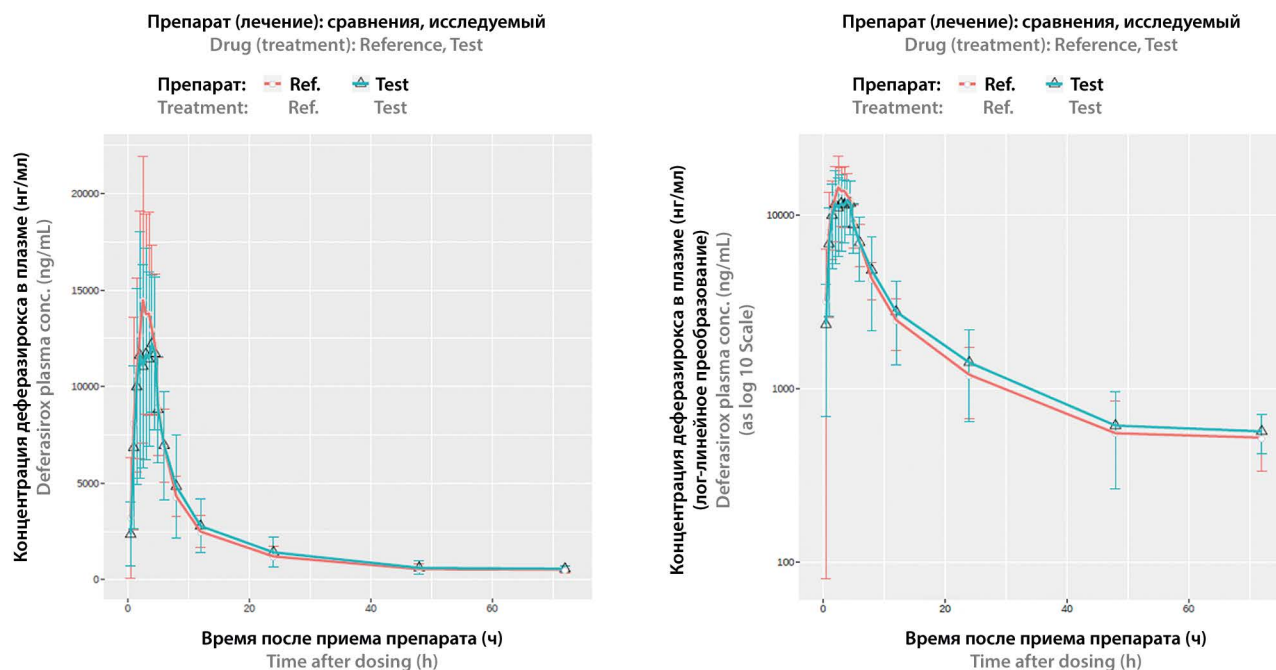


Рисунок 7. Усредненные фармакокинетические профили деферазирокса (в линейном и лог-линейном преобразовании, со стандартными отклонениями). Исследуемый препарат (Test), препарат сравнения (Ref)

Figure 7. Average pharmacokinetic profiles of deferasirox (in linear and log-linear scales, with standard deviations). Test drug (Test), Reference drug (Ref)

аналитический диапазон методики составил 0,25–70,00 мкг/мл в плазме крови, что позволяет применять разработанную методику для аналитической части исследований фармакокинетики лекарственных средств деферазирокса. Данная методика была успешно применена в рамках проведения исследования фармакокинетики и биоэквивалентности препарата отечественного производства, действующим веществом которого является деферазирокс, в сравнении с препаратом Джадену®.

Таблица 6. Значения средних арифметических и средних геометрических для фармакокинетических параметров C_{max} , AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ препаратов исследования

Table 6. Arithmetic means and geometric means values of pharmacokinetic parameters C_{max} , AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ of drugs

Параметры Parameters	Mean (GMean)	
	Test	Ref
C_{max} , нг/мл C_{max} , ng/ml	15470,69 (14835,09)	17007,17 (16156,61)
AUC_{0-t} , нг · ч/мл AUC_{0-t} , ng · hr/ml	126573,68 (117373,66)	122832,27 (116930,07)
$AUC_{0-\infty}$, нг · ч/мл $AUC_{0-\infty}$, ng · hr/ml	138394,34 (128355,91)	134336,92 (127641,14)

Примечание. Значения приведены в формате Mean (GMean), где Mean – среднее арифметическое; GMean – среднее геометрическое. Исследуемый препарат (Test), препарат сравнения (Ref).

Note. The values are presented as Mean (GMean) format; Mean is arithmetic mean; GMean is geometric mean. Test drug (Test), Reference drug (Ref).

ЛИТЕРАТУРА

- Díaz-García J. D., Gallegos-Villalobos A., Gonzalez-Espinoza L., Sanchez-Niño M. D., Villarrubia J., Ortiz A. Deferasirox Nephrotoxicity – the Knowns and Unknowns. *Nature Reviews Nephrology*. 2014;10(10):574–586. DOI: 10.1038/nrneph.2014.121.
- Yang L. P. H., Keam S. J., Keating G. M. Deferasirox. A Review of its Use in the Management of Transfusional Chronic Iron Overload. *Drugs*. 2007;67(15): 2211–2230. DOI: 10.2165/00003495-200767150-00007.
- Бабаева Т. Н., Поспелова Т. И., Нечунаева И. Н. Формирование избытка железа у пациентов с миелодиспластическим синдромом в группах промежуточного и низкого риска. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019;39(1):77–83. DOI: 10.15372/SSMJ20190111.
- Bollig C., Schell L. K., Rücker G., Allert R., Motschall E., Niemeyer C. M., Bassler D., Meerpohl J. J. Deferasirox for Managing Iron Overload in People with Thalassemia. *Cochrane Database Systematic Reviews*. 2017;8(8):CD007476. DOI: 10.1002/14651858.CD007476.pub3.
- Timoshnikov V. A., Kichigina L. A., Selyutina O. Y., Polyakov N. E., Kontoghiorghe G. J. Antioxidant Activity of Deferasirox and its Metal Complexes in Model Systems of Oxidative Damage: Comparison with Deferiprone. *Molecules*. 2021;26(16):5064. DOI: 10.3390/molecules26165064.
- Kang H., Han M., Xue J., Baek Y., Chang J. O., Hu S., Nam H., Jo M. J., Fakhri G. E., Hutchens M. P., Choi H. S., Kim J. Renal Clearable Nanochelators for Iron Overload Therapy. *Nature Communications*. 2019;10(1):1–11. DOI: 10.1038/s41467-019-13143-z.
- Piolatto A., Berchiella P., Allegra S., De Francia S., Ferrero G. B., Piga A. Pharmacological and Clinical Evaluation of Deferasirox Formulations for Treatment Tailoring. *Scientific Reports*. 2021;11(1):1–12. DOI: 10.1038/s41598-021-91983-w.
- Waldmeier F., Bruin G. J., Glaenzel U., Hazell K., Sechaud R., Warrington S., Porter J. B. Pharmacokinetics, Metabolism and Disposition of Deferasirox in β -thalassemic Patients with Transfusion-de-

- pendent Iron Overload who are at Pharmacokinetic Steady State. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010;38(5):808–816. DOI: 10.1124/dmd.109.030833.
9. Tanaka C. Clinical Pharmacology of Deferasirox. *Clinical Pharmacokinetics*. 2014;53(8):679–694. DOI: 10.1007/s40262-014-0151-4.
 10. Chen J., Xu Y., Lou H., Jiang B., Shao R., Yang D., Hu Y., Ruan Z. Effect of Genetic Polymorphisms on the Pharmacokinetics of Deferasirox in Healthy Chinese Subjects and an Artificial Neural Networks Model for Pharmacokinetic Prediction. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2020;45(6):761–770. DOI: 10.1007/s13318-020-00647-z.
 11. Paramanindita A. S., Harahap Y., Wijayanti T. R., Lusthom W., Prasaja B., Widjaja E., Sandra M., Puspanegara G. Efficacy of Deferasirox Through Bioequivalence Study in Indonesian Healthy Volunteer. *Iranian Journal of Blood and Cancer*. 2021;13(2):48–53.
 12. Onal C., Tekkeli S. E. K., Sagiroglu A. A. Liquid Chromatographic Analysis for the Determination of Deferasirox in Pharmaceutical Formulations and Spiked Plasma Samples Using Dansyl Chloride Reagent. *Journal of Chemical Metrology*. 2020;14(1):35–41. DOI: 10.25135/jcm.35.20.01.1518.
 13. Li T., Cui Z., Wang Y., Yang W., Li D., Song Q., Sun L., Ding L. A Simple LC–MS/MS Method for Determination of Deferasirox in Human Plasma: Troubleshooting of Interference from Ferric Ion in Method Development and its Application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;151:145–150. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.12.052.
 14. Golpayegani M. R., Akramipour R., Fattahi N. Sensitive Determination of Deferasirox in Blood of Patients with Thalassemia Using Dispersive Liquid-liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop Followed by HPLC–UV. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;193:113735. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113735.
 15. Onal C., Tekkeli S. E. K., Sagiroglu A. A. A Liquid Chromatographic Analysis of Deferasirox in Human Breast Milk with Fluorimetric Detection. *Chromatographia*. 2020;83(11):1329–1333. DOI: 10.1007/s10337-020-03953-5.
 16. De Francia S., Massano D., Piccione F. M., Pirro E., Racca S., Di Carlo F., Piga A. A New HPLC UV Validated Method for Therapeutic Monitoring of Deferasirox in Thalassemic Patients. *Journal of Chromatography B*. 2012;893–894:127–133. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.02.047.
 7. Piolatto A., Berchiolla P., Allegra S., De Francia S., Ferrero G. B., Piga A. Pharmacological and Clinical Evaluation of Deferasirox Formulations for Treatment Tailoring. *Scientific Reports*. 2021;11(1):1–12. DOI: 10.1038/s41598-021-91983-w.
 8. Waldmeier F., Bruin G. J., Glaenzel U., Hazell K., Sechaud R., Warrington S., Porter J. B. Pharmacokinetics, Metabolism and Disposition of Deferasirox in β -thalassemic Patients with Transfusion-dependent Iron Overload who are at Pharmacokinetic Steady State. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010;38(5):808–816. DOI: 10.1124/dmd.109.030833.
 9. Tanaka C. Clinical Pharmacology of Deferasirox. *Clinical Pharmacokinetics*. 2014;53(8):679–694. DOI: 10.1007/s40262-014-0151-4.
 10. Chen J., Xu Y., Lou H., Jiang B., Shao R., Yang D., Hu Y., Ruan Z. Effect of Genetic Polymorphisms on the Pharmacokinetics of Deferasirox in Healthy Chinese Subjects and an Artificial Neural Networks Model for Pharmacokinetic Prediction. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2020;45(6):761–770. DOI: 10.1007/s13318-020-00647-z.
 11. Paramanindita A. S., Harahap Y., Wijayanti T. R., Lusthom W., Prasaja B., Widjaja E., Sandra M., Puspanegara G. Efficacy of Deferasirox Through Bioequivalence Study in Indonesian Healthy Volunteer. *Iranian Journal of Blood and Cancer*. 2021;13(2):48–53.
 12. Onal C., Tekkeli S. E. K., Sagiroglu A. A. Liquid Chromatographic Analysis for the Determination of Deferasirox in Pharmaceutical Formulations and Spiked Plasma Samples Using Dansyl Chloride Reagent. *Journal of Chemical Metrology*. 2020;14(1):35–41. DOI: 10.25135/jcm.35.20.01.1518.
 13. Li T., Cui Z., Wang Y., Yang W., Li D., Song Q., Sun L., Ding L. A Simple LC–MS/MS Method for Determination of Deferasirox in Human Plasma: Troubleshooting of Interference from Ferric Ion in Method Development and its Application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;151:145–150. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.12.052.
 14. Golpayegani M. R., Akramipour R., Fattahi N. Sensitive Determination of Deferasirox in Blood of Patients with Thalassemia Using Dispersive Liquid-liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop Followed by HPLC–UV. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;193:113735. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113735.
 15. Onal C., Tekkeli S. E. K., Sagiroglu A. A. A Liquid Chromatographic Analysis of Deferasirox in Human Breast Milk with Fluorimetric Detection. *Chromatographia*. 2020;83(11):1329–1333. DOI: 10.1007/s10337-020-03953-5.
 16. De Francia S., Massano D., Piccione F. M., Pirro E., Racca S., Di Carlo F., Piga A. A New HPLC UV Validated Method for Therapeutic Monitoring of Deferasirox in Thalassemic Patients. *Journal of Chromatography B*. 2012;893–894:127–133. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.02.047.

REFERENCES

1. Díaz-García J. D., Gallegos-Villalobos A., Gonzalez-Espinoza L., Sanchez-Niño M. D., Villarrubia J., Ortiz A. Deferasirox Nephrotoxicity – the Knowns and Unknowns. *Nature Reviews Nephrology*. 2014;10(10):574–586. DOI: 10.1038/nrneph.2014.121.
2. Yang L. P. H., Keam S. J., Keating G. M. Deferasirox. A Review of its Use in the Management of Transfusional Chronic Iron Overload. *Drugs*. 2007;67(15): 2211–2230. DOI: 10.2165/00003495-200767150-00007.
3. Babaeva T. N., Pospelova T. I., Nechunaeva I. N. Formation of iron excess in patients with intermediate and lower-risk myelodysplastic syndrome. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2019;39(1):77–83. (In Russ.) DOI: 10.15372/SSMJ20190111.
4. Bollig C., Schell L. K., Rücker G., Allert R., Motschall E., Niemeyer C. M., Bassler D., Meerpohl J. J. Deferasirox for Managing Iron Overload in People with Thalassemia. *Cochrane Database Systematic Reviews*. 2017;8(8):CD007476. DOI: 10.1002/14651858.CD007476.pub3.
5. Timoshnikov V. A., Kichigina L. A., Selyutina O. Y., Polyakov N. E., Kontoghiorghes G. J. Antioxidant Activity of Deferasirox and its Metal Complexes in Model Systems of Oxidative Damage: Comparison with Deferiprone. *Molecules*. 2021;26(16):5064. DOI: 10.3390/molecules26165064.
6. Kang H., Han M., Xue J., Baek Y., Chang J. O., Hu S., Nam H., Jo M. J., Fakhri G. E., Hutchens M. P., Choi H. S., Kim J. Renal Clearable Nano-chelators for Iron Overload Therapy. *Nature Communications*. 2019;10(1):1–11. DOI: 10.1038/s41467-019-13143-z.
7. Piolatto A., Berchiolla P., Allegra S., De Francia S., Ferrero G. B., Piga A. Pharmacological and Clinical Evaluation of Deferasirox Formulations for Treatment Tailoring. *Scientific Reports*. 2021;11(1):1–12. DOI: 10.1038/s41598-021-91983-w.
8. Waldmeier F., Bruin G. J., Glaenzel U., Hazell K., Sechaud R., Warrington S., Porter J. B. Pharmacokinetics, Metabolism and Disposition of Deferasirox in β -thalassemic Patients with Transfusion-dependent Iron Overload who are at Pharmacokinetic Steady State. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010;38(5):808–816. DOI: 10.1124/dmd.109.030833.
9. Tanaka C. Clinical Pharmacology of Deferasirox. *Clinical Pharmacokinetics*. 2014;53(8):679–694. DOI: 10.1007/s40262-014-0151-4.
10. Chen J., Xu Y., Lou H., Jiang B., Shao R., Yang D., Hu Y., Ruan Z. Effect of Genetic Polymorphisms on the Pharmacokinetics of Deferasirox in Healthy Chinese Subjects and an Artificial Neural Networks Model for Pharmacokinetic Prediction. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2020;45(6):761–770. DOI: 10.1007/s13318-020-00647-z.
11. Paramanindita A. S., Harahap Y., Wijayanti T. R., Lusthom W., Prasaja B., Widjaja E., Sandra M., Puspanegara G. Efficacy of Deferasirox Through Bioequivalence Study in Indonesian Healthy Volunteer. *Iranian Journal of Blood and Cancer*. 2021;13(2):48–53.
12. Onal C., Tekkeli S. E. K., Sagiroglu A. A. Liquid Chromatographic Analysis for the Determination of Deferasirox in Pharmaceutical Formulations and Spiked Plasma Samples Using Dansyl Chloride Reagent. *Journal of Chemical Metrology*. 2020;14(1):35–41. DOI: 10.25135/jcm.35.20.01.1518.
13. Li T., Cui Z., Wang Y., Yang W., Li D., Song Q., Sun L., Ding L. A Simple LC–MS/MS Method for Determination of Deferasirox in Human Plasma: Troubleshooting of Interference from Ferric Ion in Method Development and its Application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;151:145–150. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.12.052.
14. Golpayegani M. R., Akramipour R., Fattahi N. Sensitive Determination of Deferasirox in Blood of Patients with Thalassemia Using Dispersive Liquid-liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop Followed by HPLC–UV. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;193:113735. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113735.
15. Onal C., Tekkeli S. E. K., Sagiroglu A. A. A Liquid Chromatographic Analysis of Deferasirox in Human Breast Milk with Fluorimetric Detection. *Chromatographia*. 2020;83(11):1329–1333. DOI: 10.1007/s10337-020-03953-5.
16. De Francia S., Massano D., Piccione F. M., Pirro E., Racca S., Di Carlo F., Piga A. A New HPLC UV Validated Method for Therapeutic Monitoring of Deferasirox in Thalassemic Patients. *Journal of Chromatography B*. 2012;893–894:127–133. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.02.047.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-197-206>
УДК 615.074; 615.31; 615.033



Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики определения инновационного препарата DD217 – ингибитора фактора Ха в плазме крови крыс с целью проведения фармакокинетического исследования

Н. С. Дубовик^{1✉}, Д. Ф. Гуранда^{3,5}, Г. В. Раменская², Д. Г. Товбин^{4,6}, Д. Н. Тарасов^{4,6},
А. Ю. Савченко⁷, В. С. Арнаутов⁴

¹ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ), 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

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

³ ООО «Фарм ИннТех», 121596, Россия, г. Москва, ул. Горбунова, д. 2

⁴ ООО «ФармаДиол», 121205, г. Москва, тер. инновационного центра Сколково, ул. Нобеля, д. 7, помещение 146

⁵ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского (НИИФХБ), МГУ имени М. В. Ломоносова, 119992, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

⁶ ФГБУН Институт химической физики им. Н. Н. Семёнова Российской академии наук (ИХФ РАН), 119991, Россия, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

⁷ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России), 143442, Россия, Московская область, Красногорский район, пос. Светлые Горы, владение 1

✉ Контактное лицо: Дубовик Наталья Сергеевна. E-mail: NSDubovik@mephi.ru

ORCID: Н. С. Дубовик – <https://orcid.org/0000-0002-6171-2496>; Д. Ф. Гуранда – <https://orcid.org/0000-0001-7500-6122>; Г. В. Раменская – <https://orcid.org/0000-0001-8779-3573>;

Д. Г. Товбин – <https://orcid.org/0000-0002-9917-0469>; Д. Н. Тарасов – <https://orcid.org/0000-0002-8106-9960>; А. Ю. Савченко – <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>;

В. С. Арнаутов – <https://orcid.org/0000-0003-3554-8941>.

Статья поступила: 07.06.2021

Статья принята в печать: 20.05.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. В настоящее время актуальной задачей для фармацевтической науки является поиск и разработка инновационных препаратов. Одним из таких является N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-((4-[этанамидоил(метил)амино]бензоил)амино)-5-метилбензамида гидрохлорид (далее – DD217) – инновационный препарат, относящийся к классу антикоагулянтов, ингибиторов фактора Ха.

Цель. Целью настоящего исследования явилась разработка и валидация методики определения DD217 в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) и применение разработанной методики для проведения фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. В исследовании были использованы аутбредные крысы Wistar. Крысам вводили раствор субстанции DD217 однократно, внутривенно в дозах 5, 15, 30 мг/кг. Для определения DD217 в плазме крови крыс применяли валидованную методику определения DD217 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). В качестве внутреннего стандарта был выбран небиволол. Хроматографическое разделение проводилось с использованием колонки Phenomenex Luna C8 (3 мкм, 50 × 4,6 мм). В качестве подвижной фазы использовали 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде и 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Общее время анализа каждого образца составляло 2,0 мин. DD217 и небиволол детектировали в режиме положительной ионизации электроспреем по ионным переходам m/z 436,1 → 119,9 и 406,0 → 151,0 соответственно. Фармакокинетические параметры и описательную статистику рассчитывали модельно-независимым методом при помощи программного обеспечения IBM SPSS Statistics v27 и Julia v1.6.0 (Mixed Models v3.8.0, ClinicalTrialUtilities v0.5.1).

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидована по следующим показателям: нижний предел количественного определения, селективность, правильность и прецизионность, допустимость разведения, линейность, эффект матрицы, степень извлечения, эффект переноса и стабильность. Нижний предел количественного определения DD217 в плазме крови крыс составил 2,0 нг/мл. Разработанная методика была успешно применена для определения фармакокинетических параметров субстанции DD217 в плазме крови крыс после внутривенного введения в дозах 5, 15, 30 мг/кг.

Заключение. Методика для количественного определения DD217 в плазме крови впервые разработана, валидована и применена для оценки фармакокинетических параметров субстанции DD217 в плазме крови крыс.

Ключевые слова: DD217, крысы, плазма, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, фармакокинетика

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

Вклад авторов. Д. Г. Товбин, Д. Н. Тарасов планировали эксперимент. Н. С. Дубовик, Д. Н. Тарасов, Д. Г. Товбин участвовали в проведении эксперимента. Н. С. Дубовик, Д. Ф. Гуранда участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. В. С. Арнаутов проводил статистическую обработку данных. Н. С. Дубовик, Д. Н. Тарасов, Д. Г. Товбин, А. Ю. Савченко, Г. В. Раменская участвовали в анализе и описании полученных результатов. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Благодарность. Работа финансировалась О. Е. Балашовым и А. И. Барановым, а также Фондом «Сколково» (грантовый договор № 20/14 от 16 июня 2014 г.) и являлась частью государственного задания 0082-2019-0003, № AAAA.-A20-120021090129-9.

Для цитирования: Дубовик Н. С., Гуранда Д. Ф., Раменская Г. В., Товбин Д. Г., Тарасов Д. Н., Савченко А. Ю., Арнаутов В. С. Разработка и валидация методики определения инновационного препарата DD217 – ингибитора фактора Ха в плазме крови крыс с целью проведения фармакокинетического исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):197–206. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-197-206>

© Дубовик Н. С., Гуранда Д. Ф., Раменская Г. В., Товбин Д. Г., Тарасов Д. Н., Савченко А. Ю., Арнаутов В. С., 2022

© Dubovik N. S., Guranda D. F., Ramenskaya G. V., Tovbin D. G., Tarasov D. N., Savchenko A. Yu., Arnautov V. S., 2022

Development and Validation of the HPLC Method for Quantification of the Innovative Drug DD217, Factor Xa Inhibitor, in Rat Plasma for a Pharmacokinetic Study

Natalia S. Dubovik¹✉, Dorel F. Guranda^{3,5}, Galina V. Ramenskaya², Dmitry G. Tovbin^{4,6}, Dmitry N. Tarasov^{4,6}, Alla Yu. Savchenko⁷, Vladimir S. Arnautov⁴

¹ National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia

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

³ LLC "Pharm InnTech", 2, Gorbunova str., Moscow, 121596, Russia

⁴ LLC "PharmaDiall", 7/146, Nobel str., ter. Innovation Center Skolkovo, Moscow, 121205, Russia

⁵ A. N. Belozersky Research Institute of Physical-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1/40, Leninskiye Gory, Moscow, 119992, Russia

⁶ N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, 4, Kosygina str., Moscow, 119991, Russia

⁷ Scientific Center for Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency, possession 1, Svetlye Gory settlement, Krasnogorsk district, Moscow region, 143442, Russia

✉ Corresponding author: Natalia S. Dubovik. E-mail: NSDubovik@mephi.ru

ORCID: Natalia S. Dubovik – <https://orcid.org/0000-0002-6171-2496>; Dorel F. Guranda – <http://orcid.org/0000-0001-7500-6122>; Galina V. Ramenskaya – <http://orcid.org/0000-0001-8779-3573>; Dmitry G. Tovbin – <https://orcid.org/0000-0002-9917-0469>; Dmitry N. Tarasov – <http://orcid.org/0000-0002-8106-9960>; Alla Yu. Savchenko – <http://orcid.org/0000-0003-2734-5036>; Vladimir S. Arnautov – <https://orcid.org/0000-0003-3554-8941>.

Received: 07.06.2021

Revised: 20.05.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. Nowadays, discovery and development of innovative drugs represent a relevant goal for the pharmaceutical market. One of such drugs is N-(5-chloropyridine-2-yl)-2-((4-[ethanimidoyl(methyl)benzoyl]amino)-5-methylbenzamide hydrochloride (hereinafter DD217), an innovative drug that belongs to the class of anticoagulants, namely factor Xa inhibitors.

Aim. The aim of this study was to develop and validate a method for DD217 determination in rat plasma by means of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) to carry out pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Outbred Wistar rats were used in the study. Rats received a single dose of DD217 substance solution intragastrically at a dose of 5, 15, 30 mg/kg. The validated HPLC-MS/MS method was employed for DD217 determination in rat plasma. Nebivolol was chosen as the internal standard of the method. Chromatographic separation involved the use of Phenomenex Luna C8 column (3 µm, 50 × 4.6 mm) and gradient elution with water-acetonitrile solution containing 0.1 % formic acid. The total run time of each sample was equal to 2.0 min. DD217 and nebivolol were detected in positive electrospray ionization mode, the ion transitions monitored were m/z 436,1 → 119,9 and 406,0 → 151,0, respectively. Pharmacokinetic parameters and descriptive statistics were calculated through model-independent method in IBM SPSS Statistics v27 and Julia v1.6.0 (MixedModels v3.8.0, ClinicalTrialUtilities v0.5.1) software.

Results and discussion. Method was validated by linearity, lower limit of quantification, selectivity, accuracy and precision, dilution integrity, matrix effect, recovery, carry-over, and stability. The lower limit of quantification of DD217 in rat plasma was 2.0 ng/mL. The method was successfully applied for establishing the pharmacokinetic parameters of DD217 substance in rat plasma after intragastric administration at a dose of 5, 15, 30 mg/kg.

Conclusion. HPLC-MS/MS method for DD217 determination in plasma was developed, validated and applied in order to evaluate pharmacokinetic parameters of DD217 substance in rat plasma.

Keywords: DD217, rat, plasma, HPLC-MS/MS, validation, pharmacokinetics

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. Dmitry G. Tovbin, Dmitry N. Tarasov planned the experiment. Natalia S. Dubovik, Dmitry N. Tarasov, Dmitry G. Tovbin participated in the experiment. Natalia S. Dubovik, Dorel F. Guranda participated in the development and validation of the bioanalytical methodology. Vladimir S. Arnautov carried out statistical data processing. Natalia S. Dubovik, DN Tarasov, Dmitry G. Tovbin, Alla Yu. Savchenko, Galina V. Ramenskaya participated in the analysis and description of the obtained results. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

Acknowledgment. The work was financed by O. E. Balashov and A. I. Baranov, as well as by the Skolkovo Foundation (grant agreement No. 20/14 dated June 16, 2014) and was part of the state assignment 0082-2019-0003, No. AAAA. -A20-120021090129-9.

For citation: Dubovik N. S., Guranda D. F., Ramenskaya G. V., Tovbin D. G., Tarasov D. N., Savchenko A. Yu., Arnautov V. S. Development and validation of the HPLC method for quantification of the innovative drug DD217, factor Xa inhibitor, in rat plasma for a pharmacokinetic study. *Drug development & registration*. 2022;11(2):197–206. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-197-206>

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания сердечно-сосудистой системы являются одними из причин инвалидизации и смертности взрослого населения экономически развитых стран мира [1]. Наиболее распространенными заболеваниями являются заболевания, вызванные нарушением свертываемости крови и образованием тромбов, в

частности инфаркт миокарда и легких, тромботические и эмболические инсульты, тромбозы и тромбозы. Высокая частота осложнений данных заболеваний и их влияние на смертность, увеличение риска летального исхода без надлежащей профилактики, затраты, связанные с лечением, способствуют широкому использованию в клинической практике различных антикоагулянтов [1–4].

Долгое время в клинической практике применялись пероральные антикоагулянты из группы антагонистов витамина К («Варфарин» и «Аценокумарол»). К недостаткам данных препаратов относят необходимость регулярного контроля уровня международного нормализованного отношения (МНО) в пределах 2,0–3,0, а также зависимость эффективности от приема ряда лекарственных препаратов и пищи [5, 6].

К 2008–2010 годам были созданы новые пероральные антикоагулянты, селективно ингибирующие один фактор свертывания: прямые ингибиторы тромбина (например, дабигатрана этексилат) и прямые ингибиторы активированного фактора X (Ха) (например, ривароксабан, апиксабан). Однако, как показали исследования, и их применение приводит к развитию многих нежелательных реакций со стороны различных органов и систем организма, а также вызванных взаимодействием с другими препаратами [5, 7–11].

В связи с этим чрезвычайно важным является поиск и разработка новых пероральных антикоагулянтов, которые бы обладали большей эффективностью, безопасностью и удобством применения.

Одним из таких препаратов может стать инновационный препарат DD217, разработанный компанией ООО «ФармаДиол» (г. Москва) [производство ФГУП НПЦ Фармзащита ФМБА России (г. Химки)] [12].

DD217 относится к классу пероральных антикоагулянтов, прямых ингибиторов фактора Ха [12]. Доклинические исследования, проведенные компанией ООО «ФармаДиол», продемонстрировали перспективность DD217. По некоторым показателям (например, концентрация, удваивающая протромбиновое время на человеческой плазме) препарат может претендовать на место лучшего в классе оральных антикоагулянтов, прямых ингибиторов фактора Ха. В результате анализа токсикологических и фармакокинетических данных DD217 был рекомендован для дальнейших исследований.

Внедрение в клиническую практику препарата DD217 может повысить приверженность пациентов терапии и снизить частоту и выраженность побочных эффектов.

Целью нашего исследования явилась разработка высокочувствительной методики количественного определения DD217 в плазме крови крыс с целью оценки фармакокинетических параметров субстанции DD217.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Германия) с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6490 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Германия).

Реактивы и растворы

В работе были использована субстанция N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-({4-[этанамидоил(метил)амино]бензоил}амино)-5-метилбензамида гидрохлорид (субстанция-порошок, производитель ФГУП НПЦ «Фармзащита», ФМБА Россия) (рисунок 1). Внутренний стандарт (ВС): небиволола гидрохлорид (серия 1, Tocris Bioscience, Великобритания) (рисунок 2). Использованные реактивы: метанол (Gradient grade, J.T. Baker, Нидерланды); муравьиная кислота (pure, PanReac AppliChem, Испания, Германия); этилацетат (Gradient grade, Sigma-Aldrich, США); ацетонитрил (Gradient grade, Scharlau, Испания); натрия бикарбонат (pure, PanReac AppliChem, Испания, Германия); вода очищенная.

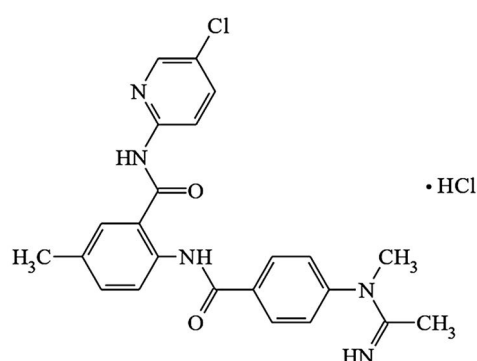


Рисунок 1. Структурная формула DD217

Figure 1. Structural formula of DD217

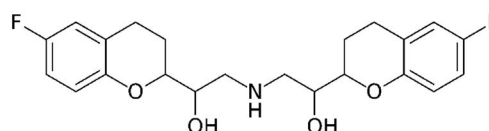


Рисунок 2. Структурная формула небиволола

Figure 2. Structural formula of nebibivolol

Маточный раствор DD217 получали путем растворения точной навески вещества в 100 мл водно-ацетонитрильного раствора (1:1). Исходные маточные растворы разбавляли смесью ацетонитрила и воды (1:1) для получения рабочих стандартных растворов с необходимыми концентрациями.

Приготовление калибровочных образцов и образцов для контроля качества (QC)

Калибровочные образцы готовили в полипропиленовых пробирках объемом 1,5 мл (Greiner Bio-One GmbH, Германия). Аликвоты рабочих стандартных растворов DD217 помещали в полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 мл, высушивали в токе азота. К сухому остатку добавляли по 200 мкл интакт-

ной плазмы. Пробирки плотно закрывали, перемешивали на вибрационном шейкере VORTEX (IKA®, Германия) при 1500 об/мин в течение 0,5 мин. Концентрация DD217 в калибровочных образцах составила 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 нг/мл. Дальнейшая процедура пробоподготовки калибровочных растворов была идентична процедуре подготовки испытуемых образцов.

Образцы для контроля качества (QC) готовили аналогично калибровочным образцам другой навески DD217. Концентрация DD217 в образцах для контроля качества была выбрана равной 5, 50, 1000 нг/мл с целью наиболее полного и равномерного охвата аналитического диапазона методики. В качестве матрицы использовали интактную плазму крови крыс, которую предварительно проверили на наличие мешающих пиков при времени удерживания DD217 и небиволола. Все калибровочные и образцы для контроля качества были приготовлены непосредственно перед анализом.

Пробоподготовка

Образцы плазмы обрабатывали следующим образом: в отдельную пробирку вместимостью 2,0 мл помещали 200 мкл испытуемого образца плазмы и 50 мкл раствора внутреннего стандарта (2,0 нг/мл). Пробирку плотно закрывали, ее содержимое перемешивали на вибрационном шейкере VORTEX (IKA®, Германия) при 2500 об/мин в течение 0,5 мин. Затем к содержимому пробирки добавляли 50 мкл раствора 1 М карбонат натрия. Пробирку плотно закрывали, ее содержимое перемешивали на шейкере при 2500 об/мин в течение 1 мин. К полученному раствору добавляли 1300 мкл этилацетата. Пробирку плотно закрывали, ее содержимое перемешивали на шейкере при 2500 об/мин в течение 10 мин. Пробирку центрифугировали при 15 000 g в течение 10 мин. Органический слой переносили в пробирку вместимостью 5 мл. К оставшейся водной фракции добавляли 50 мкл раствора карбонат натрия и повторяли процедуру экстракции. Объединенный слой экстрагента выпаривали в вакууме при 0,2 мбар при 35 °С. Далее сухой остаток растворяли в 200 мкл метанола. Полученный раствор центрифугировали при 15 000 g в течение 3 мин. Раствор над осадком переносили во флаконах для последующего анализа.

Фармакокинетическое исследование

Разработанная методика количественного определения DD217 была применена для изучения фармакокинетики субстанции DD217 у крыс. Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [13]. В эксперименте использовали аутбредных крыс Wistar массой 200 ± 30 г ($n = 128$). Раствор субстанции DD217 в 1%-м крахмальном геле вводили внутривенно в дозах 5, 15, 30 мг/кг с

помощью металлического зонда. Отбор крови производили из хвостовой вены с помощью устройства для вливания в малые вены (игла-бабочка 24G SFM, Hospital Products GmbH, Германия) в пластиковые пробирки типа «Эппендорф», содержащие антикоагулянт – цитрат натрия (3,8 %) в соотношении 1:9 к отбираемой в пробирку крови. Далее кровь центрифугировали 7 мин при 1000 об/мин (240 g), плазму переносили в другую пробирку и повторно центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Время хранения образцов плазмы при комнатной температуре составляло не более 1 ч. Образцы помещали в промаркированные и закупоренные пробирки типа «Эппендорф», затем замораживали при температуре -40 °С до проведения анализа. Фармакокинетические параметры и описательную статистику рассчитывали модельно-независимым методом при помощи программного обеспечения IBM SPSS Statistics v27 и Julia v1.6.0 (MixedModels v3.8.0, ClinicalTrialUtilities v0.5.1).

Условия хроматографического разделения и детектирования

Хроматографическое разделение определяемого вещества и внутреннего стандарта от компонентов плазмы крови достигалось при использовании колонки Luna C8 (3 мкм, $50 \times 4,6$ мм, Phenomenex США). В качестве элюента А использовали 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде, в качестве элюента Б использовали 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Хроматографический анализ проводили в градиентном режиме (0 мин – 45 % Б; 0,40 мин – 45 % Б; 0,45 мин – 75 % Б; 0,65 мин – 75 % Б; 0,70 мин – 95 % Б; 0,80 мин – 95 % Б; 0,85 мин – 45 % Б; 0,9 мин – 45 % Б) при постоянной скорости потока 1,5 мл/мин. Объем ввода составлял 5 мкл, а общее время анализа одного образца составляло 2,0 мин.

Условия масс-спектрометрического детектирования были определены на основе масс-спектров DD217 в положительном и отрицательном режимах ионизации электроспреем. Для детектирования были выбраны материнский молекулярный ион DD217 в протонированной форме (m/z 436,1) и наиболее интенсивный фрагмент его расщепления (m/z 119,9). Были оптимизированы масс-спектрометрические параметры с целью достижения наилучшей чувствительности детектирования DD217. Условия детектирования представлены в таблице 1.

В качестве внутреннего стандарта был выбран небиволол по причине близкой молекулярной структуры с DD217 и одинакового поведения с DD217 на стадиях экстракции, хроматографии и детектирования (рисунок 2). DD217 и небиволол в равной степени экстрагируются в условиях пробоподготовки, элюируют в идентичных условиях (время элюирования пиков DD217 и небиволола составляет 0,63 и 0,65 мин соответственно) и детектируются в одинаковых условиях, имеют близкую чувствительность в условиях детектирования.

Таблица 1. Условия детектирования ВЭЖХ-МС/МС

Table 1. HPLC-MS/MS detection conditions

Параметр Parameter	DD217	Внутренний стандарт (небиволол) Internal standard (neбиволол)
Тип сканирования Type of scanning	Мониторинг множественных реакций Multiple reaction monitoring	
Полярность Polarity	Положительная Positive	Положительная Positive
Источник ионизации Ionization source	Электроспрей Electrospray	
Напряжение на источнике (IS), кВ Voltage source (IS), kV	3	
Q1/Q3, m/z	436,1 → 119,9	406,0 → 151,0
Разрешение Q1 и Q3 Q1 and Q3 resolution	1,1	
Энергия соударений, В Collision energy, B	25	30
Газ-завеса, азот Curtain gas, nitrogen	350 °C / 11 л/мин 350 °C / 11 l/min	
Газ-распылитель, азот Nebulizer gas, nitrogen	200 °C / 14 л/мин 200 °C / 14 l/min	

Валидация методики

Валидация биоаналитической методики была проведена на основе правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза¹, а также руководств FDA² и EMA³ по следующим параметрам: селективность, линейность и нижний предел количественного определения (НПКО), правильность и прецизионность, эффект матрицы, стабильность, допустимость разведения, степень извлечения, эффект переноса.

Селективность

Селективность методики была оценена путем анализа 6 образцов интактной плазмы крови крыс и образцов интактной плазмы крови с введенным точ-

¹ Правила проведения исследований биоэквивалентности в рамках Евразийского экономического союза. Решение Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 г. № 85. Доступно по: <https://www.alta.ru/tamdoc/16sr0085/> Ссылка активна на 21.06.2021.

² Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). U.S. Washington: Government Printing Office; 2018. Available at: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>. Accessed: 15.09.2021.

³ Guideline on bioanalytical method validation. London: European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); 2011. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf. Accessed: 15.09.2021.

ным количеством DD217 на уровне нижнего предела количественного определения – 2,00 нг/мл и небиволола (BC) – 500 нг/мл.

Линейность

Зависимость функции отклика от концентрации определяемого вещества оценивалась в диапазоне концентраций 2–1000 нг/мл методом внутреннего стандарта. Калибровочная зависимость представлена функцией отношения площади пика аналита к площади пика BC от отношения концентрации аналита к концентрации BC в плазме крови. Калибровочные образцы готовили путем добавления DD217 и BC в известных концентрациях к холостой матрице.

Правильность и прецизионность

Для оценки правильности и прецизионности внутри одного аналитического цикла приготовили и анализировали по 5 образцов для контроля качества для каждого уровня концентраций DD217 2, 5, 50, 1000 нг/мл. Правильность методики рассчитывали по среднему значению рассчитанных концентраций относительно номинального значения. Прецизионность методики рассчитывали по величине относительного стандартного отклонения рассчитанных концентраций DD217 в образцах для контроля качества.

Правильность и прецизионность между аналитическими циклами оценивали по результатам, полученным для трех аналитических циклов, проведенных в 2 разных дня.

Эффект матрицы

Влияние биологической матрицы на количественное определение DD217 в плазме крови оценивали по нормализованному относительно BC фактору матрицы для низкой и высокой области концентраций определяемого вещества при постоянной концентрации внутреннего стандарта. Фактор матрицы рассчитывали путем деления площади пика аналита в присутствии матрицы (аналит добавляли к экстрагированному образцу матрицы) на площади пика аналита в отсутствии матрицы (раствор сравнения), содержащего такое же количество вещества. Аналогичным образом рассчитывали фактор матрицы для BC. Нормализованный фактор матрицы рассчитывали как частное от деления фактора матрицы DD217 к фактору матрицы BC.

Стабильность

Стабильность DD217 оценивали методом бреккетинга в образцах плазмы крови в условиях пробоподготовки и долгосрочного хранения, а также в анализируемых растворах при низком и высоком уровне концентрации. Стабильность в ходе замораживания-размораживания оценивали после трехкратного замораживания в течение 12 часов и размораживания образцов для контроля качества (QC). Кратковременную стабильность DD217 в испытуемых растворах

оценивали в образцах QC после выдерживания в автосэмплере в течение 24 часов при температуре $\pm 5^\circ\text{C}$. Исследования долговременной стабильности проводили после хранения при температуре не выше -60°C в течение 30 дней.

Стабильность DD217 оценивали путем сравнения свежеприготовленных образцов для контроля качества с соответствующими образцами после хранения в определенных условиях. Образцы плазмы крови крыс считались стабильными, если концентрация DD217, измеренная после хранения, была в диапазоне от -15% до $+15\%$ от номинальной концентрации.

Допустимость разведения

Допустимость разведения оценивали на основании правильности и прецизионности определения концентрации DD217 на примере пяти модельных образцов с концентрацией в 10 раз больше уровня верхнего предела количественного определения содержания DD217 в образце плазмы крови после их разбавления в 10 раз интактной плазмой крови крыс.

Степень извлечения

Степень извлечения DD217 определяли как отношение площади пика, полученного от добавленного и затем извлеченного из биологической матрицы количества вещества в сравнении с сигналом детектора, полученного от раствора сравнения, содержащего такое же количество вещества, когда аналит добавляется к экстрагированному образцу матрицы. Степень извлечения определяли при низком и высоком уровне концентрации DD217.

Эффект переноса

Перенос пробы определяли по отношению площади пика на хроматограмме холостого образца, анализируемого непосредственно после анализа калибровочного образца или образца для контроля качества с уровнем содержания DD217, равном верхнему пределу количественного определения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Количественное определение DD217 в плазме крови проводили посредством валидированной методики на основе ВЭЖХ с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Процедура пробоподготовки включала две последовательные стадии экстракции: высушивания объединенного слоя экстрагента, растворения сухого остатка перед анализом. Хроматографическое разделение проводили на обращенно-фазовой колонке C8. Аналитический сигнал детектировали методом tandemной масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем. DD217 детек-

тировали по расщеплению молекулярного иона с величиной m/z 436,1 $\rightarrow$ 119,9. Концентрацию DD217 в испытуемых образцах рассчитывали методом внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта использовали небиволола гидрохлорид. Небиволол детектировали по расщеплению молекулярного иона с величиной m/z 406,0 $\rightarrow$ 151,0.

Валидация

Селективность

На хроматограммах интактной плазмы крови не наблюдалось пиков с временами удерживания, соответствующих DD217 и небивололу. На рисунке 3 представлены хроматограммы интактной плазмы и плазмы с добавлением DD217 до 20 мг/мл и небиволола до 500 мг/мл.

Линейность и НПКО

НПКО для DD217 был определен на уровне 2,0 нг/мл. Отношение сигнал/шум на хроматограмме испытуемого раствора модельного образца с концентрацией DD217, равной 2,0 нг/мл, было равно 10. Средние значения концентраций калибровочных образцов были в пределах $\pm 15\%$ от номинального значения для уровня концентраций выше НПКО и в пределах $\pm 20\%$ для уровня НПКО. Все три исследованные калибровочные зависимости были линейными в диапазоне концентраций 2–1000 нг/мл для DD217. Коэффициенты корреляции (R) были выше 0,9980.

Правильность и прецизионность

Значения внутрисерийной и межсерийной правильности и прецизионности приведены в таблицах 2, 3. Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанная методика является точной, по показателям правильности и прецизионности, для определения концентраций DD217 в плазме крови крыс.

Таблица 2. Внутрисерийная правильность и прецизионность методики определения концентраций DD217 в плазме крови крыс (n = 5)

Table 2. Intrabatch accuracy and precision of the method for determination of DD217 concentrations in plasma of rats (n = 5)

Введено (нг/мл) Injected (ng/ml)	Найдено (нг/мл), среднее значение Found (ng/ml), mean value	Относительное стандартное отклонение (%) Relative standard deviation (%)	Правильность (%) Accuracy (%)
2	2,07 $\pm$ 0,16	7,49	103,5
5	5,21 $\pm$ 0,43	8,29	104,2
50	50,01 $\pm$ 2,13	4,26	100,0
1000	998,85 $\pm$ 5,58	0,56	99,9

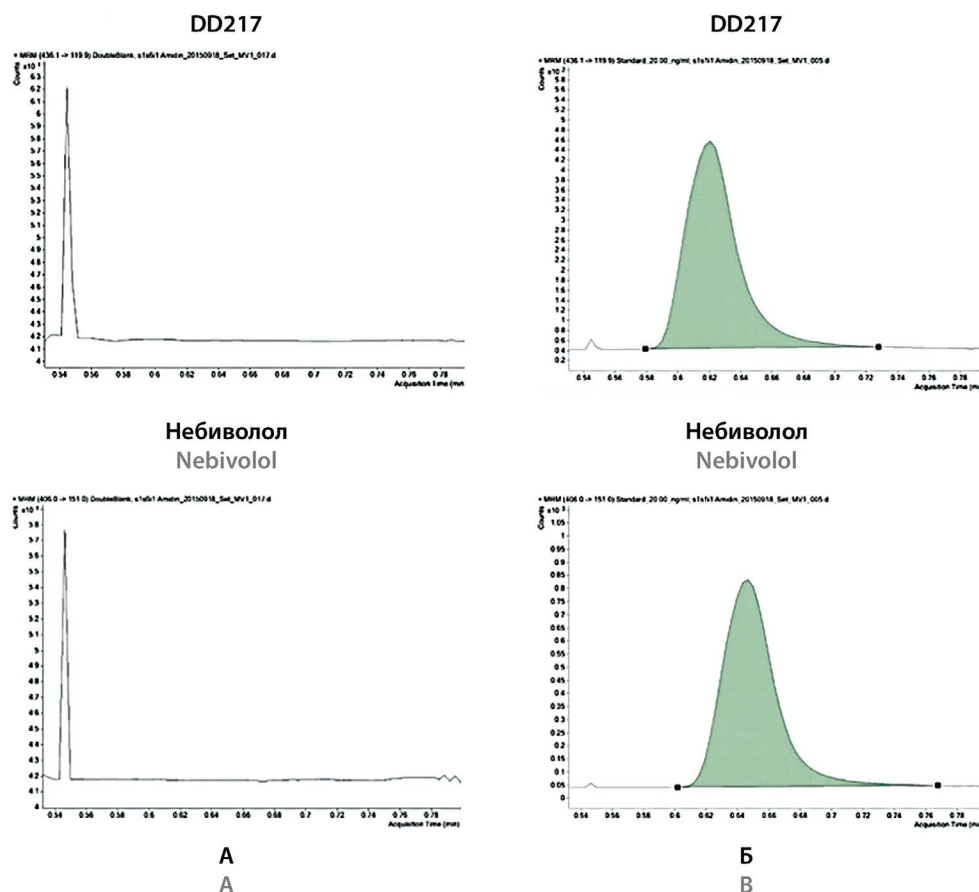


Рисунок 3. Хроматограммы интактной плазмы и плазмы с добавлением DD217

А – хроматограмма образца интактной плазмы крови; **Б** – хроматограммы образцов плазмы крови, содержащие DD217 (20,00 нг/мл) и небиволола (BC)

Figure 3. Chromatograms of Intact Plasma and Plasma Supplemented with DD217

A – chromatogram of a blank plasma sample; **B** – chromatograms of plasma samples containing DD217 (20.00 ng/ml) and nebivolol (IS)

Таблица 3. Межсерийная правильность и прецизионность методики определения концентраций DD217 в плазме крови крыс ($n = 15$)

Table 3. Interbatch accuracy and precision of the method for determination of DD217 concentrations in plasma of rats ($n = 15$)

Введено (нг/мл) Injected (ng/ml)	Найдено (нг/мл), среднее значение Found (ng/ml), mean value	Относительное стандартное отклонение (%) Relative standard deviation (%)	Правильность (%) Accuracy (%)
2	2,02 ± 0,18	9,03	101,4
5	5,15 ± 0,49	9,56	103,0
50	49,79 ± 2,30	4,62	99,6
1000	992,95 ± 14,10	1,42	99,3

Эффект матрицы

Фактор матрицы, нормализованный по ВС, находится в диапазоне 0,85–1,04. Таким образом, коэффициент вариации фактора матрицы, нормализованный по ВС, находится в пределах $\pm 15\%$ (таблица 4).

Стабильность

Проведенные исследования стабильности показали, что DD217 был стабильным в образцах плазмы крови при различных условиях хранения на низком и высоком уровне концентрации. Было доказано, что DD217 стабилен после выдерживания в автосэмплере в течение 24 часов. Исследования показали, что концентрации DD217 оставались в пределах $\pm 15\%$ от номинальных концентраций после хранения при -60°C в течение 30 дней и после трехкратной заморозке-разморозке в течение 30 минут (-80°C ; $+5^\circ\text{C}$). Результаты приведены в таблицах 5–7.

Допустимость разведения

Значения правильности и прецизионности методики в разведенном модельном образце относительно введенного количества с учетом разбавления отвечали требованиям правильности и прецизионности методики (таблица 8).

Таблица 4. Эффект матрицы DD217 в плазме крови крыс (n = 6)

Table 4. Matrix effect of DD217 in plasma in rats (n = 6)

Уровень содержания, нг/мл Drug level, ng/ml	Введено, нг/мл Injected, ng/ml	Модельный образец Modeling sample		Раствор сравнения Reference solution		Матричный фактор нормализованный Normalized matrix factor				
		Площадь пика DD217 Peak area of DD217	Площадь пика ВС Peak area of IS	Площадь пика DD217 Peak area of DD217	Площадь пика ВС Peak area of IS	Найдено Found	Среднее Mean	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation	Критерий пригодности Suitability criterion	Соответствие критерию Compliance with the criterion
5	5	11,51	75,6	6,48	50,4	1,04	0,997	4,2	Не более 15 % Not more than 15 %	Соответствует Corresponds
		10,68	77,0	11,21	72,6	0,95				
		10,68	73,6	11,81	84,5	0,99				
		10,38	66,5	11,39	70,8	1,06				
		10,83	77,1	11,06	80,9	0,96				
		11,20	77,9	11,17	71,5	0,98				
1000	1000	1981	78,64	2106	80,64	0,98	0,981	1,4	Не более 15 % Not more than 15 %	Соответствует Corresponds
		2168	86,74	2103	79,95	0,97				
		1870	72,28	2001	76,80	1,01				
		1585	63,64	2155	85,21	0,97				
		1934	78,20	2028	82,76	0,96				
		2148	85,07	3570	138,91	0,98				

Таблица 5. Стабильность DD217 в условиях хранения

Table 5. Stability of DD217 in the storage conditions

Введено, нг/мл Injected, ng/ml	Найдено в модельном образце после 30 дней хранения при температуре не выше –60 °C Found in a modeling sample after 30 days at temperature not above –60 °C	Найдено в свежеприготовленном модельном образце Found in a freshly prepared modeling sample	Средняя раскрываемость, % Mean recovery, %	Критерий пригодности Suitability criterion	Соответствие критерию Compliance with the criterion
5	4,75	4,51	99,5	Не менее 85 % и не более 115 % Not less than 85 % and not more than 115 %	Соответствует Corresponds
	4,37	5,04			
	4,41	4,65			
	4,70	4,47			
	4,82	4,52			
1000	987,54	972,72	99,3	Не менее 85 % и не более 115 % Not less than 85 % and not more than 115 %	Соответствует Corresponds
	988,44	981,37			
	957,71	960,26			
	975,74	990,23			
	963,79	1002,97			

Степень извлечения

Отклонение значения степени извлечения при низком (5 нг/мл) и высоком (1000 нг/мл) уровне содержания DD217 от среднего значения не превышало 15 %. Таким образом, методика удовлетворяет критерию пригодности по показателю степень извлечения.

Эффект переноса

На хроматограммах холостых образцов для определения переноса пробы отклик сигнала аналита составлял не более 20 % от отклика сигнала DD217 с со-

держанием на уровне нижнего предела количественного определения, а отклик сигнала ВС составил не более 5 % от отклика сигнала пика ВС на хроматограмме холостого образца, что удовлетворяет критерию пригодности по показателю эффект переноса.

Таким образом, валидация разработанной методики была успешно проведена по следующим параметрам: селективность, линейность и нижний предел количественного определения (НПКО), правильность и прецизионность, эффект матрицы, стабильность, допустимость разведения, степень извлечения, эффект переноса.

Таблица 6. Стабильность DD217 в условиях пробоподготовки

Table 6. Stability of DD217 in the conditions of sample preparation

Введено, нг/мл Injected, ng/ml	Найдено в модельном образце после трехкратной заморозке-разморозке Found in a modeling sample after a three-fold freezing-thawing	Найдено в свежеприготовленном модельном образце Found in a freshly prepared modeling sample	Средняя раскрываемость, % Mean recovery, %	Критерий пригодности Suitability criterion	Соответствие критерию Compliance with the criterion
5	4,81	4,51	102,7	Не менее 85 % и не более 115 % Not less than 85 % and not more than 115 %	Соответствует Corresponds
	4,39	5,04			
	5,06	4,65			
	5,11	4,47			
	4,43	4,52			
1000	1019,39	972,72	101,9	Не менее 85 % и не более 115 % Not less than 85 % and not more than 115 %	Соответствует Corresponds
	983,92	981,37			
	971,51	960,26			
	1013,33	990,23			
	1013,53	1002,97			

Таблица 7. Стабильность аналитических растворов в условиях анализа

Table 7. Stability of test solutions in the analysis conditions

Введено, нг/мл Injected, ng/ml	Найдено в модельном образце после 24 ч хранения в автоинжекторе при +5 °C Found in a modeling sample after 24 h storage in an auto-injector at +5 °C	Найдено в свежеприготовленном модельном образце Found in a freshly prepared modeling sample	Средняя раскрываемость, % Mean recovery, %	Критерий пригодности Suitability criterion	Соответствие критерию Compliance with the criterion
5	4,36	4,51	94,6	Не менее 85 % и не более 115 % Not less than 85 % and not more than 115 %	Соответствует Corresponds
	4,35	5,04			
	4,41	4,65			
	4,36	4,47			
	4,44	4,52			
1000	981,82	972,72	102,0	Не менее 85 % и не более 115 % Not less than 85 % and not more than 115 %	Соответствует Corresponds
	996,28	981,37			
	1013,74	960,26			
	993,35	990,23			
	1021,31	1002,97			

Таблица 8. Правильность и прецизионность при десятикратном разведении

Table 8. Accuracy and precision in a ten-fold dilution

Введено (нг/мл) Injected (ng/ml)	Найдено (нг/мл), среднее значение Found (ng/ml), mean value	RSD (%)	Раскрываемость (%) Recovery (%)
10000	1006,73 ± 24,42	2,43	100,7

Фармакокинетическое исследование

Разработанная и валидированная методика ВЭЖХ-МС/МС применялась для определения концентраций DD217 в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения субстанции в дозах 5, 15, 30 мг/кг.

Фармакокинетический анализ проводился на основе разреженных данных (sparse sample design). Профили DD217 и основные фармакокинетические параметры представлены на рисунке 4 и в таблице 9 соответственно.

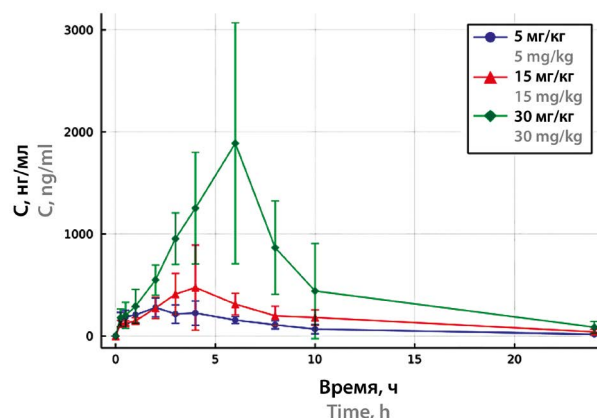


Рисунок 4. Усредненные фармакокинетические профили DD217 после внутривенного введения субстанции DD217 крысам. DD217 вводили в дозах 5 (●), 15 (▲), 30 (◆) мг/кг

Figure 4. Averaged pharmacokinetic profiles of DD217 following intragastric administration of substance DD217 to rats. DD217 was administered in doses 5 (●), 15 (▲), 30 (◆) mg/kg

Таблица 9. Усредненные значения фармакокинетических параметров субстанции DD217 при внутрижелудочном введении крысам

Table 9. Averaged values of pharmacokinetic parameters of substance DD217 following intragastric administration to rats

Параметр Parameter	Значение Value		
	5 мг/кг 5 mg/kg	15 мг/кг 15 mg/kg	30 мг/кг 30 mg/kg
C_{max} (нг/мл) C_{max} (ng/ml)	279,00	475,36	1889,19
T_{max} (ч) T_{max} (h)	2,0	4,0	6,0
$T_{1/2}$ (ч) $T_{1/2}$ (h)	5,52	6,76	5,18
MRT (ч) MRT (h)	7,79	9,76	8,45
AUC_{0-t} (ч · нг/мл) AUC_{0-t} (h · ng/ml)	2290,17	4343,22	13371,01
$AUC_{0-\infty}$ (ч · нг/мл) $AUC_{0-\infty}$ (h · ng/ml)	2423,61	4736,05	14019,05
Cl (л/ч/кг) Cl (l/h/kg)	2,06	3,17	2,14
V_d (л/кг) V_d (l/kg)	16,42	30,90	16,00

Полученные данные показали, что субстанция DD217 постепенно всасывается в системный кровоток ($T_{max} = 2-6$ ч). Величины объема распределения (16–30 л/кг) свидетельствуют о том, что DD217 накапливается в тканях органов. Период полувыведения DD217 составляет около 5–6 ч, среднее время удержания препарата в крови – 7–9 ч, общий клиренс – 2–3 л/ч/кг. В связи с тем, что дизайн исследования не предполагал получения индивидуальных фармакокинетических профилей, описательная статистика не вычислялась.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методика ВЭЖХ-МС/МС для количественного определения DD217 в плазме крови впервые разработана и валидирована по следующим параметрам: нижний предел количественного определения, селективность, правильность и прецизионность, допустимость разведения, линейность, эффект матрицы, степень извлечения, эффект переноса, стабильность биообразцов в условиях хранения и пробоподготовки, стабильность аналитических растворов в условиях анализа. Методика была успешно применена для оценки фармакокинетических параметров субстанции DD217 в плазме крови крыс.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Glushchenko V. A., Irklienko E. K. Cardiovascular morbidity is one of the most important public health problems. *Medicine and Health Organization*. 2019;4(1):56–63. (In Russ.)
- Mensah G. A., Roth G. A., Fuster V. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors: 2020 and Beyond. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(20):2529–2532. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.10.009.
- Weitz J. I., Harenberg J. New developments in anticoagulants: Past, present and future. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017;28;117(7):1283–1288. DOI: 10.1160/TH16-10-0807.

- McGrath E. R., Go A. S., Chang Y., Borowsky L. H., Fang M. C., Reynolds K., Singer D. E. Use of Oral Anticoagulant Therapy in Older Adults with Atrial Fibrillation After Acute Ischemic Stroke. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2017;65(2):241–248. DOI: 10.1111/jgs.14688.
- Di Minno A., Frigerio B., Spadarella G., Ravani A., Sansaro D., Amato M., Baldassarre D. Old and new oral anticoagulants: Food, herbal medicines and drug interactions. *Blood Reviews*. 2017;31(4):193–203. DOI: 10.1016/j.blre.2017.02.001
- Marzec L. N., Wang J., Shah N. D., Chan P. S., Ting H. H., Gosch K. L., Hsu J. C., Maddox T. M. Influence of Direct Oral Anticoagulants on Rates of Oral Anticoagulation for Atrial Fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2017;69(20):2475–2484. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.03.540.
- Lippi G., Gosselin R., Favaloro E. J. Current and Emerging Direct Oral Anticoagulants: State-of-the-Art. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2019;45(05):490–501. DOI: 10.1055/s-0039-1692703.
- Shimada K., Hasegawa S., Nakao S., Mukai R., Sasaoka S., Ueda N., Kato Y., Abe J., Mori T., Yoshimura T., Kinoshita Y., Nakamura M. Adverse reaction profiles of hemorrhagic adverse reactions caused by direct oral anticoagulants analyzed using the Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System (FAERS) database and the Japanese Adverse Drug Event Report (JADER) database. *Int J Med Sci*. 2019;16(9):1295–1303. DOI: 10.7150/ijms.34629
- de Candia M., Lopopolo G., Altomare C. Novel factor Xa inhibitors: A patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2009;19(11):1535–1580. DOI: 10.1517/13543770903270532.
- Kozielec M., Lip G. Y. H. Estimating individual lifetime benefit and bleeding risk of adding oral anticoagulation to aspirin for patients with stable cardiovascular disease: directions from COMPASS? *European Heart Journal*. 2019;7;40(46):3779–3781. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz517.
- Vranckx P., Valgimigli M., Heidbuchel H. The significance of drug-drug and drug-food interactions of oral anticoagulation. *Arrhythmia Electrophysiol Rev*. 2018;7:55–61. DOI: 10.15420/aer.2017.50.1.
- Tarasov D. N., Tovbin D. G., Malakhov D. V., Aybush A. V., Tserkovnikova N. A., Savelyeva M. I., Savchenko A. Y. The Development of New Factor Xa Inhibitors Based on Amide Synthesis. *Current Drug Discovery Technologies*. 2018;15(4):335–350. DOI: 10.2174/1570163815666180215114732.
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union / Luxembourg: Publications Office of the European Union*. 2010;53:33–79.

К юбилею Раменской Галины Владиславовны



7 мая 2022 года мы отметили юбилей директора Института фармации Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), доктора фармацевтических наук, профессора **Галины Владиславовны Раменской**.

Г. В. Раменская окончила очное отделение фармацевтического факультета Московской медицинской академии имени И. М. Сече-

нова по специальности «фармация» в 1994 году. Была награждена медалью имени И. М. Сеченова за лучшую студенческую научную работу.

Обучаясь в очной аспирантуре кафедры фармацевтической химии, она в 1994 году защитила кандидатскую диссертацию по теме «Разработка методов анализа и стандартизации нового отечественного препарата из группы 1,4-бензодиазепаина» по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. В качестве соискателя этой же кафедры выполняла докторскую диссертационную работу по теме «Высокоэффективная жидкостная хроматография в оценке биотрансформации лекарственных средств (фармакогенетика и фармакокинетика)», которую успешно защитила в 2003 году по специальностям 15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия и 14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология. В 2006 году **Г. В. Раменской** присвоено звание профессора. В 2015 г. она получила звание «почетный профессор Южно-Казахстанской химико-фармацевтической академии».

Область научных интересов **Г. В. Раменской** касается физико-химических методов анализа и их применения в исследованиях различных групп лекарственных средств, в том числе биологического происхождения. Также в круг ее научных интересов входит фармакокинетика и моделирование поведения лекарственных средств в организме человека и животных.

Галина Владиславовна – ученица академика РАН А. П. Арзамасцева, является продолжателем традиций отечественной научной школы в области физико-химических методов анализа, фармакокинетики и биодоступности лекарственных средств. Научные достижения **Г. В. Раменской** получили высокую оценку в научном мире. Результаты научной и учебно-методической работы **Г. В. Раменской** представлены более чем в 300 российских и международных научных изданиях, в том числе журналах, индексируемых в РИНЦ, Scopus, WoS, в 7 монографиях, национальных руководствах и более 30 учебниках и учеб-

ных пособиях, в трех патентах. Ряд научных трудов отмечены различными премиями и дипломами. Под научным руководством **Галины Владиславовны** и ее научном консультировании защищено 50 диссертаций (46 кандидатские и 4 докторские), из них 5 иностранными гражданами.

В 2008 г. в составе коллектива авторов ей присуждена премия Правительства РФ в области науки и техники за работу «Оптимизация лекарственной терапии на основе изучения биотрансформации и транспортеров лекарственных средств». В рамках данной работы **Галиной Владиславовной** разработаны методики количественного определения ряда лекарственных средств и их метаболитов, изучено влияние различных факторов на биотрансформацию лекарственных средств, метаболизирующихся цитохромом P-450. В 2003 г. **Галина Владиславовна** была награждена медалью имени И. М. Сеченова за лучшую научную работу – научная монография «Витамины и микроэлементы в клинической фармакологии». В 2004 г. она в составе коллектива авторов была удостоена премии г. Москвы за работу «Новое отечественное лекарственное средство для лечения опийной наркомании «Продетоксон, депо-таблетки для имплантации». За научный труд «Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины» в 2009 году **Г. В. Раменская** с соавторами получила премию РАН им. Н. П. Кравкова.

Галина Владиславовна активно ведет общественную работу. В разное время она являлась членом фармацевтической комиссии Фармакопейного комитета, членом комиссии по клинической фармакологии (биоэквивалентности), заместителем председателя и председателем Комитета по этике, вице-президентом Общества фармакогенетики, фармакокинетики и персонализированной терапии и также заместителем председателя АНО «Международная ассоциация клинических фармакологов и фармацевтов». **Г. В. Раменская** имеет Благодарность (2006 г.) и Почетную грамоту (2007 г.) Федеральной службы в сфере здравоохранения и социального развития, Почетную грамоту Минздрава России (2012 г.). В настоящее время является заместителем председателя Совета по государственной фармакопее Минздрава России.

Галину Владиславовну отличают широта кругозора и способность организовать плодотворную работу научного коллектива. Она является признанным специалистом в области физико-химических методов анализа, фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных средств, пользуется заслуженным авторитетом в профессиональной среде и является активным продолжателем традиций отечественной научной школы.

Редакция «Разработка и регистрация лекарственных средств», коллеги и друзья поздравляют **Галину Владиславовну** с юбилеем и желают ей здоровья, счастья, удачи и успехов во всех делах и начинаниях!

К юбилею Деминой Натальи Борисовны



В 2022 году отмечает свой шестидесятипятый юбилей профессор, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической технологии Сеченовского Университета, бессменный член редакционной коллегии научных журналов, научный консультант, руководитель и наставник **Наталья Борисовна Демина**.

Наталья Борисовна окончила Первый Московский медицинский институт имени И. М. Сеченова в 1979 году. В 1985 году защитила кандидатскую диссертацию на тему «Микрокапсулирование панкреатина и его аналогов микробного происхождения» под научным руководством член-корреспондента РАН профессора Тенцовой Антонины Ивановны. В 2003 году состоялась защита диссертации **Натальи Борисовны** на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук на тему «Разработка научных и экспериментальных основ получения лекарственных препаратов с использованием высокомолекулярных соединений», где научным консультантом выступал академик РАН и РАСХН Быков Валерий Алексеевич.

За время работы на кафедре фармацевтической технологии **Демина Наталья Борисовна** прошла путь от старшего лаборанта до профессора. Имеет почетные звания «Заслуженного работника высшей школы» и «Отличника здравоохранения».

В различные годы занимала значимые должности в структуре фармацевтического факультета Сеченовского Университета (с 1992 по 1998 гг. – завуч кафедры, с 1998 по 2004 гг. – заместитель декана фармацевтического факультета). На сегодняшний день и на протяжении уже девяти лет **Наталья Борисовна** продолжает являться ученым секретарем диссертационного совета Сеченовского Университета по фармацевтическим наукам. Сложно недооценить вклад

профессора **Деминой** в работу ДСУ 2008.002.001, где в год защищаются несколько десятков диссертационных работ.

По сей день профессор **Демина** осуществляет активную деятельность в сфере своих научных интересов – современных полимеров для использования в фармацевтической технологии. Она является ведущим специалистом в фармацевтической разработке, внесла значимый вклад в изучение научных основ разработки твердых лекарственных форм с модифицированным высвобождением, в создание лекарственных форм с растительными субстанциями, методов гранулирования. Ежегодно за ее авторством публикуются статьи в высокорейтинговых как российских, так и международных журналах. **Наталья Борисовна** – автор более 150 научных работ, патентов, монографий и учебных пособий.

Наталья Борисовна успешно продолжает традиции отечественной школы биофармации, заложенные Антониной Ивановной Тенцовой. Профессором **Деминой** инициировано введение дисциплины «Биофармация» в учебный план обучающихся Института фармации Сеченовского Университета, а также разработаны учебно-методические пособия для реализации учебной программы.

В 2021 году свет увидело фундаментальное учебное пособие по фармацевтической технологии в двух томах под совместной редакцией с профессором И. И. Краснюком.

Научная школа, основанная на биофармацевтических принципах, полнится многочисленными учениками **Натальи Борисовны** – за более чем сорок лет научно-педагогической деятельности профессор **Демина** подготовила десятки аспирантов и молодых ученых, продолжающих традиции отечественной школы фармацевтической разработки лекарственных средств.

Российское фармацевтическое научное сообщество, коллеги и благодарные ученики сердечно поздравляют **Наталью Борисовну** с днем рождения, желают ей крепкого здоровья, больше радостных моментов и неиссякаемого научного интереса!



a Hyve event

24-я Международная
выставка оборудования,
сырья и технологий
для фармацевтического
производства

Забронируйте
стенд

22-25
ноября
2022



Москва,
Крокус Экспо

pharmtech-expo.ru

+7 (495) 799-55-85
pharmtech@hyve.group



ОРГАНИЗАТОР
ORGANISER

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этического поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля «Разработка и регистрация лекарственных средств» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», должно соответствовать науке:

- 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 предоставляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

Таблицы

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ *. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

Рисунки

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подрисуночной подписью на русском и английском языках. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутрисуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник, представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подрисуночных подписей на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате *.tif, *.jpg, *.cdr, *.ai, с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номеру рисунка.

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**



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

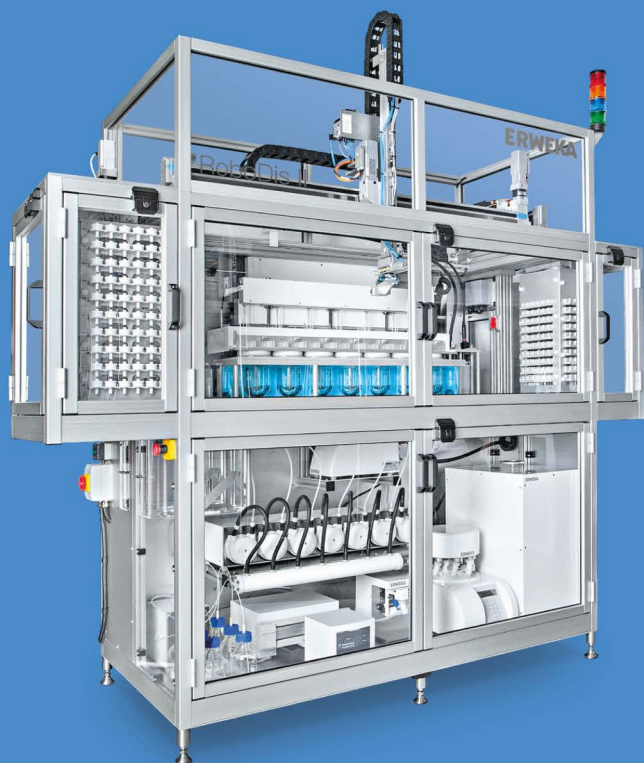
DT 950 Series

ЦИФРОВОЕ
ТЕСТИРОВАНИЕ
РАСТВОРЕНИЯ



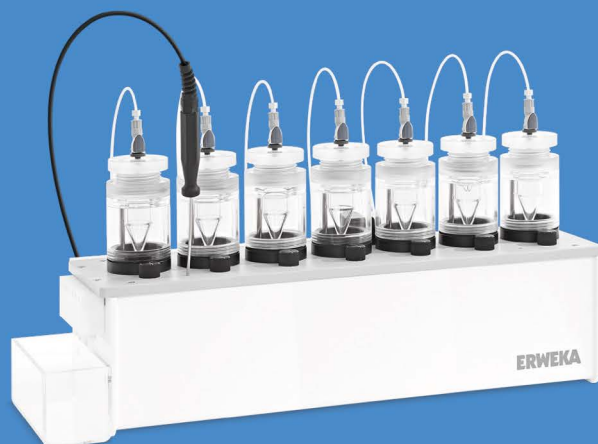
RoboDis II+

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